

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**INGRIDD AYSLANE TORRES DE ARAÚJO RIBEIRO**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton rudolphianus* Müll. Arg. (Euphorbiaceae)**

RECIFE  
2016

INGRIDD AYSLANE TORRES DE ARAÚJO RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton rudolphianus* Müll. Arg. (Euphorbiaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração Bioquímica e Fisiologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Tereza dos Santos Correia  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Vanusa da Silva

RECIFE  
2016

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Ribeiro, Ingrid Ayslane Torres de Araújo**

**Caracterização química e atividades biológicas do óleo essencial de *Croton rudolphianus* Müll. Arg. (Euphorbiaceae)/ Ingrid Ayslane Torres de Araújo  
Ribeiro- Recife: O Autor, 2016.**

**118 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia**

**Coorientadora: Márcia Vanusa da Silva**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2016.**

**Inclui referências e anexos**

- 1. Inseticidas vegetais 2. Microrganismos fitopatogênicos 3.  
Euphorbiaceae I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora) II.  
Silva, Márcia Vanusa da (coorientadora) III. Título**

**668.651**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2017-060**

INGRIDD AYSLANE TORRES DE ARAÚJO RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton rudolphianus* Müll. Arg. (Euphorbiaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração Bioquímica e Fisiologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 03/08/2016

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Tereza dos Santos Correia (Presidente)

---

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Titular Externo 1)

---

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Titular Interno 1)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Maria Guedes Paiva (Titular Interno 2)

Dedico este trabalho a minha avó Socorro,  
a minha mãe Fabiana e a minha tia Fátima

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela dádiva da vida, pelas pessoas que colocou em meu caminho, por ter me dado força, saúde e paciência, e por ter iluminado meu caminho para que pudesse concluir mais uma etapa na minha vida.

À minha família, em especial, a mãe Fabiana, minha avó Socorro, tia Fátima e tio Fabiano por todo amor, cuidado, dedicação, apoio, ensinamentos, ajuda e compreensão em todos os momentos da minha vida.

À minha prima-irmã mais velha Shyrlane por todo carinho, ajuda, conselhos, incentivo e por várias vezes me tirar de momentos de solidão.

Ao meu namorado João Henrique pelo amor, carinho, ajuda, paciência e por sempre estar comigo nos momentos em que mais preciso.

Aos meus amigos, Aline Maria, Carla Rodrigues, Mayara Nunes, Renata Santos e Romero Carneiro pelos momentos de descontração e companheirismo.

À minha amiga e companheira de laboratório Rosimere da Silva pela ajuda, momentos de descontração e por muitas vezes me ouvir e dar conselhos.

Aos meus companheiros do Laboratório de Produtos Naturais, Alexsandra Carvalho, Ana Paula, Amanda Dias, Bruna Cordeiro, Cibele Maria, Luiz Filipe, Joelma Pessoa, Paula Fernanda e Tiago Silva pela força, ajuda, disponibilidade e companheirismo.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Tereza dos Santos Correia, pela oportunidade, acolhimento, paciência, confiança e ensinamentos em todas as etapas da minha pesquisa.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Vanusa da Silva, pela oportunidade, acolhimento e contribuições na realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro, do Departamento de Química Fundamental da UFPE, e ao Dr. Paulo Milet-Pinheiro pela realização da análise cromatográfica do óleo essencial e pela disponibilidade.

Ao Dr. Alexandre Gomes da Silva, do Instituto Nacional do Semiárido, pelos ensinamentos, conselhos e coletas realizadas.

Aos Professores da Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica da UFPE, em especial ao Prof. Dr. Thiago Napoleão, pela disponibilidade, envolvimento e comprometimento com esse trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial a João Antônio Virgínio, pela disposição em nos ajudar, ensinar e resolver alguns problemas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Departamento de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia pela oportunidade de estudo.

E enfim, a todos aqueles que de uma forma direta ou indiretamente contribuíram para que esse momento se tornasse uma realidade na minha vida.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação  
e persistência em se chegar a um objetivo.  
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e  
vence obstáculos, no mínimo fará coisas  
admiráveis.”*

(José de Alencar)



## RESUMO

Os microrganismos fitopatogênicos em condições ambientais favoráveis podem constituir um fator limitante à exploração econômica de plantas, uma vez que, causam vários danos às culturas como podridão, murcha, cancro e até a morte do vegetal. Geralmente o controle dos fitopatogênicos e insetos praga é realizado através da aplicação de pesticidas sintéticos. No entanto, o uso excessivo e indiscriminado desses pesticidas tem levado a vários problemas, incluindo a poluição ambiental, efeitos secundários na saúde humana e desenvolvimento de populações de insetos resistentes. Por isso, a busca de formas alternativas para o controle de pragas e doenças de plantas tem sido estimulada. Os óleos essenciais (OE's) são misturas de compostos voláteis que possuem diversas atividades biológicas. O gênero *Croton* é o maior da família Euphorbiaceae e algumas das suas espécies apresentam atividades inseticida e antimicrobiana. Este estudo investigou a composição química do óleo essencial (OE) das folhas de *Croton rudolphianus*, bem como os seus efeitos inseticida e repelente sobre *Sitophilus zeamais*, e atividade antimicrobiana contra bactérias fitopatogênicas. O OE foi extraído por hidrodestilação e a sua caracterização química foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). O potencial inseticida foi avaliado através de ensaios de toxicidade por contato, fumigação e ingestão. Além disso, o efeito repelente foi avaliado. Por sua vez, o efeito antimicrobiano foi avaliado através da determinação das concentrações mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMI e CMB, respectivamente) utilizando as bactérias fitopatogênicas *Acidovorax citrulli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Um total de 77 compostos foi identificado no OE de *C. rudolphianus*, sendo o composto majoritário o metil chavicol (20,55%), seguido de (*E*)-cariofileno (11,21%), biciclogermacreno (10,23%), germacreno D (7,51%) e limoneno (7,01%). O OE apresentou atividade inseticida contra adultos de *S. zeamais* por contato (LC<sub>50</sub> 70,64 µL/mL), fumigação (melhor taxa de mortalidade de 43,75% a uma concentração de 64 µL/L) e ingestão (LC<sub>50</sub> 107,26 µL/g). Além disso, o OE exerceu efeitos em dois parâmetros nutricionais (taxa de consumo relativo e eficiência de conversão da comida ingerida) dos insetos e foi atraente para *S. zeamais* adultos. OE de *C. rudolphianus* mostrou atividade antifitopatogênica contra cinco bactérias, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, com o melhor valor de MIC e MBC de 1,56 e 25 µL/mL (contra *Ralstonia solanacearum* e *Pectobacterium carotovorum* subsp., respectivamente). Esses resultados demonstram que o OE de *C. rudolphianus* é uma potencial alternativa no controle de *S. zeamais* e de bactérias fitopatogênicas.

**Palavras-chave:** Atividade antifitopatogênica. *Croton rudolphianus*. Inseticida. Metabólitos secundários.

## ABSTRACT

Phytopathogenic microorganisms under favorable environmental conditions can be a limiting factor for the economic exploitation of plants, since they cause several damages to the crops cultivations as rot, wilt, canker and even the death of plant. Generally the control of phytopathogens and pest insects is carried out through the application of synthetic pesticides. However, the excessive and indiscriminate use of these synthetic pesticides has led to several problems, including environmental pollution, side effects in human health and development of resistant insect populations. Because of this, search for alternative ways to control pests and plant diseases has been stimulated. The essential oils (EO's) are mixtures of volatile compounds that have several biological activities. The *Croton* genus is the major of the family Euphorbiaceae and some of its species showed insecticidal and antimicrobial activity. This study investigated the chemical composition of the essential oil (EO) from *Croton rudolphianus* leaves, as well as its insecticidal and repellent effects on *Sitophilus zeamais*, and antimicrobial activity against phytopathogenic bacteria. The EO was extracted by hydrodistillation and its chemical characterization was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The insecticidal potential was evaluated through assays of contact, fumigation and ingestion toxicity. Besides that, the repellent effect was evaluated. In turn, the antimicrobial effect was evaluated through the determination of the minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations (MIC and MBC, respectively) using the phytopathogenic bacteria *Acidovorax citrulli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. A total of 77 compounds were identified in the EO from *C. rudolphianus*, where the major compound was methyl chavicol (20,55%), following by (*E*)-caryophyllene (11,21%), bicyclogermacrene (10,23%) germacrene D (7,51%) and limonene (7,01%). The EO showed insecticidal activity against *S. zeamais* adults by contact (LC<sub>50</sub> 70.64 µL/mL), fumigation (the best mortality rate of 43,75% at 64 µL/L) and ingestion (LC<sub>50</sub> 107.26 µL/g). In addition, the oil exerted effects on nutritional parameters (relative consumption rate and efficiency in conversion of ingested food) of insects and it was attractive to *S. zeamais* adults. EO of *C. rudolphianus* showed anti-phytopathogenic activity against five bacteria (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*), with the best MIC and MBC values of 1,56 and 25 µL/mL (against *Ralstonia solanacearum* e *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, respectively). These results showed that the *C. rudolphianus* oil is a potential alternative in the control of *S. zeamais* and phytopathogenic bacteria.

**Keyword:** Anti-phytopathogenic activity. *Croton rudolphianus*. Insecticidal. Secondary metabolites.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Localização do Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau), Pernambuco, Brasil.....	19
<b>Figura 2</b> - Esboço geral das vias de biossíntese dos metabólitos secundários em vegetais.....	21
<b>Figura 3</b> - Unidade de isopreno (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ).....	22
<b>Figura 4</b> - Estrutura básica dos flavonoides.....	24
<b>Figura 5</b> - Fatores que afetam a síntese dos metabólitos secundários em vegetais.....	26
<b>Figura 6</b> - Principais fatores ambientais que influenciam a síntese de metabólitos secundários nos vegetais.....	27
<b>Figura 7</b> - Estrutura química dos componentes dos óleos essenciais.....	30
<b>Figura 8</b> - Hidrodestilador.....	32
<b>Figura 9</b> - Desenho representativo de <i>Croton rudolphianus</i> Müller Argoviensis.....	44
<b>Figura 10</b> - Desenho representativo de <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky.....	46

## LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1

	Página
<b>Fig. 01</b> - Mortality rate on <i>Sitophilus zeamais</i> by ingestion toxicity of <i>Croton rudolphianus</i> essential oil.....	92
<b>Fig. 02</b> - Nutritional parameters of <i>Sitophilus zeamais</i> adults maintained on artificial diets containing solution of <i>Croton rudolphianus</i> essential oil.....	93
<b>Fig. 03</b> - Mortality rate on <i>Sitophilus zeamais</i> by contact toxicity of <i>Croton rudolphianus</i> essential oil.....	94
<b>Fig. 04</b> - Mortality rate on <i>Sitophilus zeamais</i> by fumigant toxicity of <i>Croton rudolphianus</i> essential oil.....	94
<b>Fig. 05</b> - Repelence index of <i>Croton rudolphianus</i> essential oil on <i>Sitophilus zeamais</i> ....	95

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Classificação dos terpenos encontrados nos vegetais.....	22
<b>Tabela 2</b> - Composição química dos óleos essenciais obtidos das folhas se algumas espécies de gênero <i>Croton</i> .....	38

## LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 1

<b>Table 01</b> - Chemical composition of essential oils from <i>C. rudolphianus</i> leaves.....	90
<b>Table 02</b> - Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of the essential oil from <i>Croton rudolphianus</i> leaves against phytopathogenic bacterial.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva para 50% da população
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (do inglês: GC-MS)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: HPLC)
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória para 50% da população
IC <sub>50</sub>	Inibição de crescimento para 50% da população
CL <sub>50</sub>	Concentração letal para 50% da população (do inglês: LC <sub>50</sub> )
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50% da população
TL <sub>50</sub>	Tempo letal para 50% da população
TL <sub>95</sub>	Tempo letal para 95% da população
CMB	Concentração mínima bactericida (do inglês: MBC)
CMI	Concentração mínima inibitória (do inglês: MIC)
CO <sub>50</sub>	Concentração ovicida para 50% da população
OD <sub>50</sub>	Oviposição deterrente para 50% da população
OE	Óleo essencial
PARNA	Parque Nacional
PC	Pressão crítica
CP <sub>50</sub>	Concentração pupicida para 50% da população
TC	Temperatura crítica

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>18</b>
2.1	CAATINGA.....	18
2.2	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	19
<b>2.2.1</b>	<b>Biossíntese de metabólitos secundários em vegetais.....</b>	<b>20</b>
2.2.1.1	Terpenos.....	20
2.2.1.2	Compostos fenólicos.....	23
2.2.1.3	Compostos nitrogenados.....	23
<b>2.2.2</b>	<b>Fatores que influenciam a biossíntese de metabólitos secundários.....</b>	<b>24</b>
2.2.2.1	Fatores genéticos.....	25
2.2.2.2	Fatores ontogenéticos.....	25
2.2.2.3	Fatores morfogenéticos.....	25
2.2.2.4	Fatores ambientais.....	26
2.3	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	27
<b>2.3.1</b>	<b>Definição e características dos óleos essenciais.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Histórico de uso dos óleos essenciais.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Composição química dos óleos essenciais.....</b>	<b>29</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Métodos de extração dos óleos essenciais.....</b>	<b>31</b>
2.3.4.1	Hidrodestilação.....	32
2.3.4.2	Arraste a vapor.....	33
2.3.4.3	Extração com solventes orgânicos.....	33
2.3.4.4	Prensagem a frio.....	33
2.3.4.5	Enfloração.....	33
2.3.4.6	Extração por fluido supercrítico.....	34
2.3.4.7	Extração por fluido subcrítico.....	34

2.3.4.8	Extração assistida por ultrassom.....	35
2.3.4.9	Extração assistida por micro-ondas.....	35
<b>2.3.5</b>	<b>Importância ecológica e econômica dos óleos essenciais.....</b>	<b>35</b>
2.4	FAMÍLIA EUPHORBIACEAE.....	36
<b>2.4.1</b>	<b>Gênero <i>Croton</i>.....</b>	<b>36</b>
2.4.1.1	Composição química dos óleos essenciais do gênero <i>Croton</i> .....	37
2.4.1.2	Atividades biológicas dos óleos essenciais do gênero <i>Croton</i> .....	40
2.4.1.3	<i>Croton rudolphianus</i> .....	43
2.5	BIOINSETICIDAS.....	44
<b>2.5.1</b>	<b>Emprego de OE's como bioinseticidas.....</b>	<b>45</b>
2.6.	<i>Sitophilus zeamais</i> .....	45
2.6.1.1	Emprego de OE's no controle de <i>Sitophilus zeamais</i> .....	47
2.7	MICROORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS.....	47
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>50</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	50
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	50
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>67</b>
	ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO CROP PROTECTION...	67
	<b>Chemical characterization, insectidal effect against <i>Sitophilus zeamais</i> and anti-phytopathogenic activity of essential oil from <i>Croton rudolphianus</i> leaves.....</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>96</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>97</b>
	<b>Anexo - A:</b> Autorização para atividades com finalidade científica, emitida pelo Ministério do Meio Ambiente – MMA - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO).....	98

<b>Anexo - B: Crop Protection- Instructions for Authors.....</b>	<b>101</b>
--	------------



## 1. INTRODUÇÃO

O uso excessivo e indiscriminado de pesticidas sintéticos acarreta vários problemas relacionados à saúde humana e ao meio ambiente, como (i) contaminação da água e do solo, (ii) intoxicação de produtores rurais, (iii) alteração no controle biológico natural e polinização, (iv) e estabelecimento de resistência de insetos, microrganismos fitopatogênicos e ervas daninhas aos produtos utilizados (BRAVO *et al.*, 2011). Em virtude disso, buscar formas alternativas para o controle de pragas, como o uso de pesticidas provenientes de fontes naturais (microrganismos ou vegetais), também conhecidos como biopesticidas, é essencial para minimizar os danos ecológicos (DUTTA, 2015).

*Sitophilus zeamais* é um inseto praga do milho que também pode atacar outros hospedeiros (FAZOLIN *et al.*, 2010), provocando desvalorização comercial, perda no valor nutritivo e diminuição no poder germinativos de sementes (LORINI, 2003). Em adição, é considerado uma das principais pragas de grãos armazenados no Brasil (NAPOLEÃO *et al.*, 2015). Além dos insetos pragas, os microrganismos fitopatogênicos causam alguns danos às culturas como podridão, murcha, cancro, tombamento e até a morte do vegetal (BUENO; FISCHER, 2006).

Compostos provenientes do metabolismo secundário dos vegetais vêm sendo estudados quanto ao seu potencial inseticida e antimicrobiano. Como exemplo os óleos essenciais (OE's) provenientes de *Croton campestris* e *Croton heliotropiifolius*, onde o primeiro foi ativo contra microrganismos fitopatogênicos como *Rhizopus oryzae* (AZEVEDO *et al.*, 2013), já o último mostrou atividade frente a *Tribolium castaneum* e *Sitophilus zeamais* (MAGALHÃES *et al.*, 2015).

De acordo com Amorati *et al.* (2013) e Bakkali *et al.* (2008), os OE's são uma mistura complexa de substâncias voláteis e lipofílicas provenientes do metabolismo secundário vegetal e desempenham um papel importante na proteção dos vegetais como antibacteriano, antifúngico, antiviral e inseticida.

Esses óleos podem ser encontrados em diversas famílias vegetais, como Anacardiaceae, Annonaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae e Myrtaceae. Dentre a família Euphorbiaceae, *Croton* é o seu maior gênero e possui cerca 1.300 espécies distribuídas predominantemente nas regiões tropicais (LIMA; PIRANI, 2008). Os membros desse gênero são utilizados na medicina

para tratar diversas doenças incluindo malária, inflamações, diabetes e câncer (SALATINO *et al.*, 2007), além de algumas espécies de *Croton* apresentarem atividades inseticida: *C. heliotropiifolius* (*C. rhamnifolioides*) (MAGALHÃES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2014), *C. argyrophyloides*, *C. nepetaefolius*, *C. sonderianus* e *C. grewioides* (*C. zehntneri*) (LIMA *et al.*, 2013); e antimicrobiana: *Croton cajucara* (AZEVEDO *et al.*, 2013), *C. campestris* (ALMEIDA *et al.*, 2013), *C. grewioides* (*C. zehntneri*), *C. argyrophyloides* e *C. nepetaefolius* (FONTENELLE *et al.*, 2008).

No Brasil, existem aproximadamente 311 espécies de *Croton* descritas (FLORA DO BRASIL, 2016) que estão distribuídas em todo país (SECCO *et al.*, 2012). Já em Pernambuco, são registradas 38 espécies encontradas principalmente nas regiões semiáridas (FLORA DO BRASIL, 2016). No entanto, vale ressaltar que algumas dessas espécies permanecem sem informações sobre a composição química ou mesmo potenciais atividades biológicas, como *C. rudolphianus*, popularmente conhecido como velame-branco (SILVA *et al.*, 2010).

Levando em consideração essa escassez de informações a cerca da composição química e atividades biológicas de *C. rudolphianus*, este trabalho teve como objetivo investigar a composição química, e potencial antimicrobiano e inseticida de OE das folhas de *C. rudolphianus*.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 CAATINGA

A Caatinga é um mosaico de arbustos espinhosos e florestas sazonalmente secas que se estende por cerca de 845.000 km<sup>2</sup> (BRASIL, 2016a) e cobre os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (LEAL *et al.*, 2005). Em adição, é um bioma exclusivo do Brasil, compreendendo 11% do território nacional (BRASIL, 2016a) e aproximadamente 60% da região do Nordeste brasileiro (SILVA; ALBUQUERQUE, 2005), sendo limitado a leste e a oeste pelas florestas Atlântica e Amazônica, respectivamente, e ao sul pelo Cerrado (LEAL *et al.*, 2005).

A Caatinga apresenta algumas características peliculares dentre os parâmetros meteorológicos como alta radiação solar, baixa nebulosidade, alta temperatura média anual, baixas taxas de umidade relativa, evapotranspiração elevada, e sistema de chuvas irregular, com precipitação média anual variando de 500 a 800 mm. Pode ser caracterizada por possuir vegetação arbórea ou arbustiva, compreendendo principalmente árvores e arbustos baixos, muitos dos quais apresentam espinhos e microfilia (PRADO, 2003).

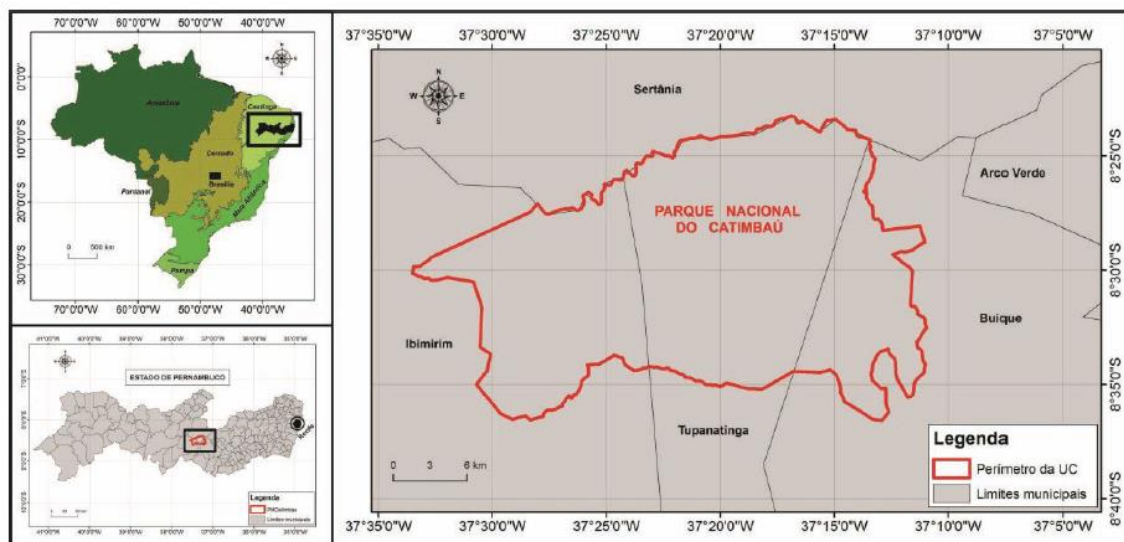
De acordo com Maia (2004), a Caatinga possui uma vasta diversidade de espécies vegetais, sendo Fabaceae (278 espécies), Convolvulaceae (103 espécies), Euphorbiaceae (73 espécies), Malpighiaceae (71 espécies), Poaceae (66 espécies) e Cactaceae (57 espécies) as famílias mais frequentes desse bioma. Além disso, 318 espécies vegetais são consideradas endêmicas do bioma (TABARELLI; SILVA, 2003).

No entanto, mesmo sendo um bioma exclusivamente brasileiro, com alta diversidade biológica e grande taxa de endemismo, a vegetação da Caatinga é uma das que mais sofre interferências humanas no Brasil. Além do mais, ela apresenta o menor número e a menor extensão protegida dentre todos os biomas brasileiros (PRADO, 2003).

Atualmente, a Caatinga possui 30 Unidades de Conservação (BRASIL, 2016b), dentre elas encontra-se o Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau) (Figura 1), que foi criado em dezembro de 2002. O PARNA do Catimbau encontra-se localizado nos Municípios de Ibirimirim, Tupanatinga e Buíque, no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Ele possui 62.300 km<sup>2</sup> e tem o objetivo de conservar os ecossistemas naturais, além de possibilitar a

realização de pesquisas científicas e o desenvolvimento de atividades de educação ambiental e turismo ecológico (BRASIL, 2002).

**Figura 1** - Localização do Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau), Pernambuco, Brasil.



Fonte: Melo (2012).

## 2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas, animais e microrganismos representam um reservatório de produtos naturais, e desempenham um papel fundamental no processo de descoberta e desenvolvimento de novos compostos bioativos (BRUSOTTI *et al.*, 2014). Além disso, o Reino Vegetal, em especial, oferece uma grande variedade de espécies que podem ser empregadas como alternativas na síntese de produtos químicos e usados no controle de insetos pragas e vetores de doenças (LÓPEZ *et al.*, 2011), bem como no tratamento de diversas enfermidades (BRUSOTTI *et al.*, 2014). No entanto, grande parte das espécies vegetais com atividades biológicas permanece inexplorada (LI; VEDERAS, 2009). Dessa forma, estudos sobre essas potenciais fontes de compostos biologicamente ativos são necessários.

De modo suplementar, é importante ressaltar que os vegetais possuem dois metabolismos, responsáveis pela produção de metabólitos com diferentes funções, são eles: (i) metabólitos primários e (ii) metabólitos secundários. Os primários são substâncias imprescindíveis ao desenvolvimento e sobrevivência dos organismos, e desempenham funções essenciais no vegetal,

como, fotossíntese, respiração e transporte de soluto. Além do mais, os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas, por exemplo, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios (MIRANDA, 2010).

Por outro lado, os metabólitos secundários podem estar presentes ou não nos vegetais dependendo das variáveis ecológicas, e desempenham um papel importante nas interações entre as plantas e o ambiente, como na defesa contra herbívoros e patógenos, bem como, na atração de polinizadores e microrganismos simbiotes (BRUSOTTI *et al.*, 2014). Além do mais, conforme Figueiredo e colaboradores (2008): (i) os metabólitos secundários são geralmente sintetizados a partir dos metabólitos primários, (ii) alguns são específicos de gêneros e espécies (podendo ser utilizados como caracteres taxonômicos na classificação das plantas), (iii) protegem o vegetal de influências externas (temperatura, umidade, proteção contra raios UV), (iv) e podem ser acumulados em vacúolos ou em algumas estruturas secretoras, como por exemplo, tricomas.

No entanto, a extração, purificação e caracterização dos metabólitos secundários ainda é um grande desafio no processo de descoberta de novos compostos bioativos, uma vez que, esses metabólitos estão presentes em pequenas quantidades no material vegetal (BRUSOTTI *et al.*, 2014).

### **2.2.1 Biossíntese de metabólitos secundários em vegetais**

De acordo com Verma e Shukla (2015), os metabólitos secundários dos vegetais podem ser agrupados em três principais grupos químicos, são eles: terpenos, compostos fenólicos (fenilpropanóides e flavonoides) e compostos nitrogenados (alcalóides, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos).

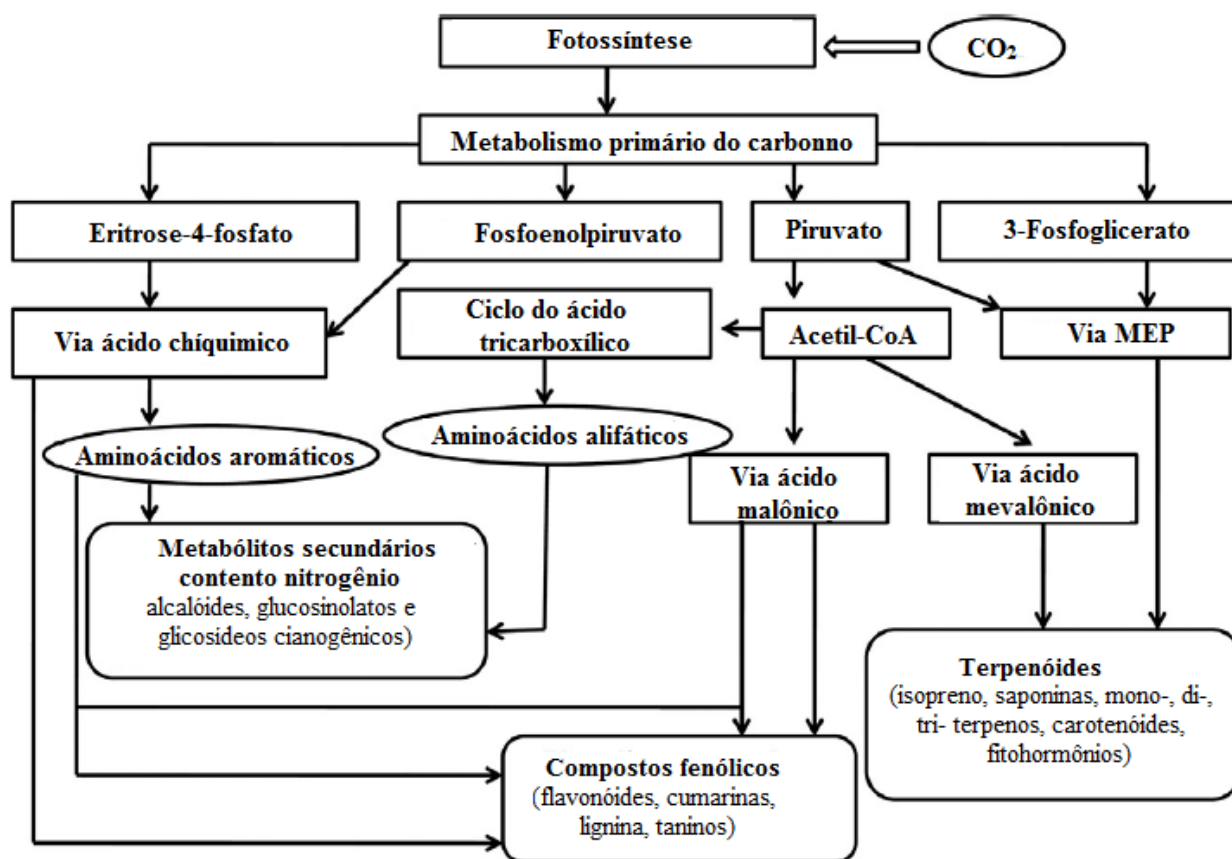
#### **2.2.1.1 Terpenos**

Os terpenos, também conhecidos como terpenóides ou isoprenóides, desempenham um papel crucial nos vegetais, uma vez que, estes compostos podem atrair polinizadores e agir como inseticidas (TAIZ; ZEIGER, 2012).

Esses compostos são sintetizados a partir de duas vias metabólicas distintas. A primeira via ocorre no citoplasma através do mevalonato ou ácido mevalônico. Já, a segunda se sucede nos

cloroplastos pelo metileritritol 4-fosfato (em inglês: MEP, methylerythritol 4-phosphate) derivado piruvato ou 3-fosfoglicerato (Figura 2) (VERMA; SHUKLA, 2015).

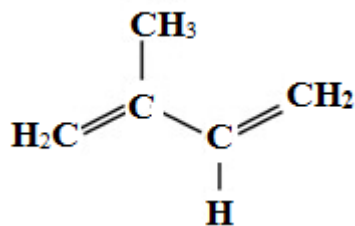
**Figura 2** - Esboço geral das vias de biossíntese dos metabólitos secundários em vegetais.



Fonte: adaptado de Verma; Shukla (2015).

Além disso, todos os terpenóides são formados pela fusão de unidades de cinco carbonos (unidade de isopreno) (Figura 3). Com base no número destas unidades que se ligam entre si, é possível classificar os terpenos em diferentes grupos como mostra a Tabela 1 (VERMA; SHUKLA, 2015).

Os monoterpenos apresentam baixo peso molecular, e são os principais constituintes dos óleos essenciais (OE's) e das essências voláteis, atuando principalmente na atração de polinizadores e repelência de insetos pragas (PERES, 2004).

**Figura 3** - Unidade de isopreno (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>).

Os sesquiterpenos, assim como os monoterpenos atuam na defesa contra pragas e doenças. Já, os diterpenos compreendem um grande grupo de compostos que possuem diversas atividades biológicas como fitohormônios (giberelina), e ácidos resínicos. Em contra partida, os triterpenos formam componentes das resinas, látex, ceras, cutícula dos vegetais e saponinas (PERES, 2004).

**Tabela 1** - Classificação dos terpenos encontrados nos vegetais.

<b>Número de unidades de isopreno</b>	<b>Número de átomos de carbono</b>	<b>Classes</b>	<b>Exemplos</b>
1	5	Isopreno	Cadeia lateral das citocininas
2	10	Monoterpenos	Óleos essenciais
3	15	Sesquiterpenos	Ácido abscísico
4	20	Diterpenos	Giberelina e paclitaxel
6	30	Triterpenos	Brassinoesteroide e saponinas
8	40	Tetraterpenos	Carotenoides e xantofilas
N	N	Politerpenos	Borracha

Fonte: adaptado de Verma; Shukla (2015); Taiz; Zeiger (2012) e Bakkali *et al.* (2008).

Por sua vez, os tetraterpenos mais conhecidos são os carotenoides e xantofilas, que são pigmentos relacionados com os processos fotossintéticos e com a pigmentação de flores e frutos, além de importantes dissipadores de radicais livres gerados na fotossíntese (PERES, 2004).

Ainda, existem os politerpenos, que resultam da fusão de mais de oito unidades de isoprenos, e esses terpenos contêm compostos como ubiquinonas e polímeros longos encontrados, por exemplo, no látex (CROTEAU *et al.*, 2000).

### 2.2.1.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são formados por pelo menos um anel aromático, no qual, no mínimo um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (OH-) (ACHAKZAI *et al.*, 2009). No que diz respeito à síntese desses compostos, existem duas rotas metabólicas, são elas: a do ácido malônico e a do ácido chiquímico (Figura 2) (VERMA; SHUKLA, 2015). Conforme Taiz e Zeiger (2012), a rota do ácido chiquímico é mais comum nos vegetais, sendo ela responsável pela biossíntese da maioria dos compostos fenólicos nesses organismos. Já, a rota do ácido malônico é mais comum em bactérias e fungos.

Este grupo de compostos exerce funções importantes nos vegetais, incluindo, reprodução, crescimento e defesa contra estresses bióticos e abióticos (ACHAKZAI *et al.*, 2009). Em adição, também possuem atividades alelopáticas, nas quais, ocorre a redução no crescimento de plantas vizinhas (TAIZ; ZEIGER, 2012), e antioxidante, devido a sua capacidade de doar átomos de hidrogênio aos radicais livres (NAGHILOO *et al.*, 2012). Ainda podem ser utilizados como um indicador de estresse, pois há um aumento na síntese de compostos fenólicos em vegetais expostos a produtos químicos e condições de estresse (ACHAKZAI *et al.*, 2009).

De acordo com Fang e colaboradores (2011), os fenóis podem ser classificados em diferentes grupos como flavonoides, ligninas, lignanas, cumarinas, taninos, estilbenos, estilpironas e arilpironas. Sendo os flavonoides o grupo mais importante da classe fenólica. Eles constituem um amplo grupo de pigmentos vegetais que apresentam uma estrutura química constituída por três anéis, sendo dois aromáticos (A e B) unidos por um anel heterocíclico oxigenado (C) (Figura 4) (PROBST, 2012). Além disso, desempenham um papel crucial tanto no crescimento e mecanismos de defesa, contra microrganismos e insetos (TAIZ; ZEIGER, 2012), quanto na atração de polinizadores e dispersores de sementes (SIMÕES *et al.*, 2010).

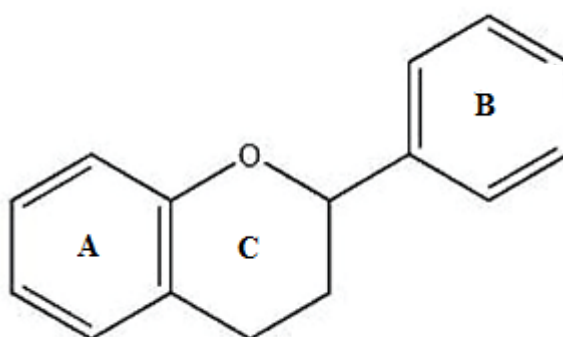
### 2.2.1.3 Compostos nitrogenados

A terceira classe de metabólitos secundários inclui compostos contendo nitrogênio, tais como alcaloides, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos (VERMA; SHUKLA, 2015). Os alcaloides, produtos naturais de baixo peso molecular, são sintetizados tanto a partir de alguns aminoácidos aromáticos, como triptofano e tirosina (os quais são derivados do ácido chiquímico)



quanto de aminoácidos alifáticos, como a ornitina e lisina (Figura 2) (TAIZ; ZEIGER, 2012). Além disso, esta classe de metabólitos possui substâncias que apresentam acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas utilizadas como analgésicos, venenos e alucinógenos. De acordo com os aminoácidos precursores, os alcaloides podem ser classificados em: (i) piperidínicos (lisina), (ii) isoquinolínicos (tirosina), (iii) indólicos (triptofano), (iv) pirrolidínicos (ornitina) e (v) tropânicos (ornitina) (PERES, 2004).

**Figura 4** - Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: adaptado de Simões *et al.* (2010).

Outros compostos nitrogenados encontrados nos vegetais são os glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos, que fazem parte do sistema de defesa dos vegetais. Os glicosídeos cianogênicos liberam o cianeto de hidrogênio (em inglês: HCN), composto extremamente volátil e muito tóxico (TAIZ; ZEIGER, 2012). Por sua vez, os glucosinolatos são responsáveis pelo cheiro e sabor em vegetais como repolho, brócolis, rabanete, entre outros (VERMA; SHUKLA, 2015).

### 2.2.2 Fatores que influenciam a biossíntese de metabólitos secundários

A síntese de metabólitos secundários é um processo complexo que está sujeito à influência de quatro principais fatores como mostra a Figura 5.

### 2.2.2.1 Fatores genéticos

Segundo Verma e Shukla (2015), a síntese de metabólitos secundários em vegetais ocorre sob o controle genético. Uma vez que, o código genético atua diretamente na produção de enzimas, e estas, por sua vez, atuam nas reações que ocorrem nas rotas metabólicas dos produtos naturais. Então, se houver alguma alteração nos genes do vegetal isso pode acarretar a síntese de diferentes as enzimas que vão catalizar diferentes reações metabólicas, que por sua vez vai gerar um metabólito secundário distinto.

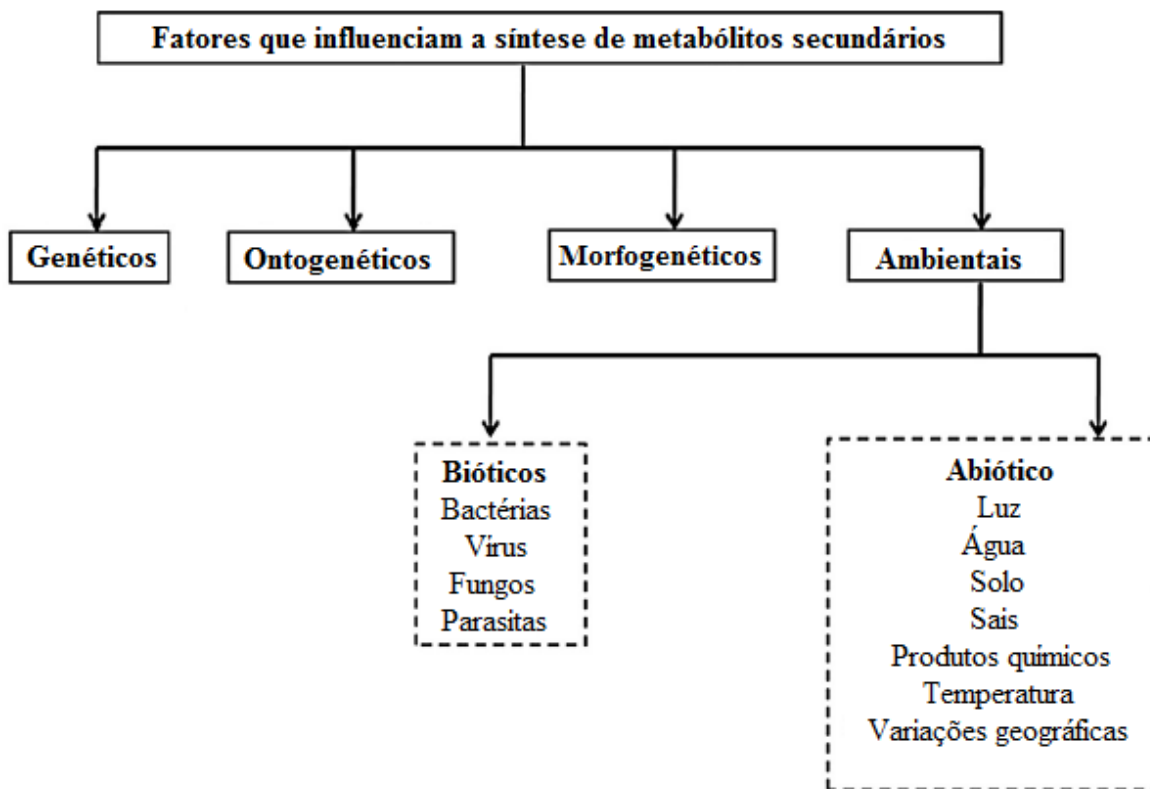
### 2.2.2.2 Fatores ontogenéticos

A ontogenia é a sequência completa de acontecimentos envolvidos no desenvolvimento de um organismo. Começa a partir de sementes e passa por diferentes estágios de desenvolvimento, como as fases de plântula, juvenil, de maturação e de senescência (VERMA; SHUKLA, 2015). Adicionalmente, essas diferentes fases do vegetal afetam a concentração dos metabólitos secundários, como terpenos (BARTON, 2007), compostos fenólicos, alcaloides (ELGER *et al.*, 2009), glicosídeos cianogênicos (GOODGER *et al.*, 2006) e proteínas de defesa, (DOAN *et al.*, 2004) em resposta a necessidade do vegetal em cada fase do seu desenvolvimento, como proteção, atração de polinizadores e dispersores de sementes.

### 2.2.2.3 Fatores morfogênicos

Os vegetais possuem tecidos com funções especializadas, como secreção, armazenamento e suporte. A maioria das substâncias naturais é sintetizada a partir de tecidos secretores, e eles variam em estrutura, localização e material secretado. Conforme Verma e Shukla (2015), diferentes tecidos possuem vias metabólicas distintas, e conseqüentemente metabólitos secundários diferentes. Ou seja, a biossíntese de determinado metabólito pode esta restrita a um tecido particular (PICHERSKY; GANG, 2000).

**Figura 5** - Fatores que afetam a síntese dos metabólitos secundários em vegetais.



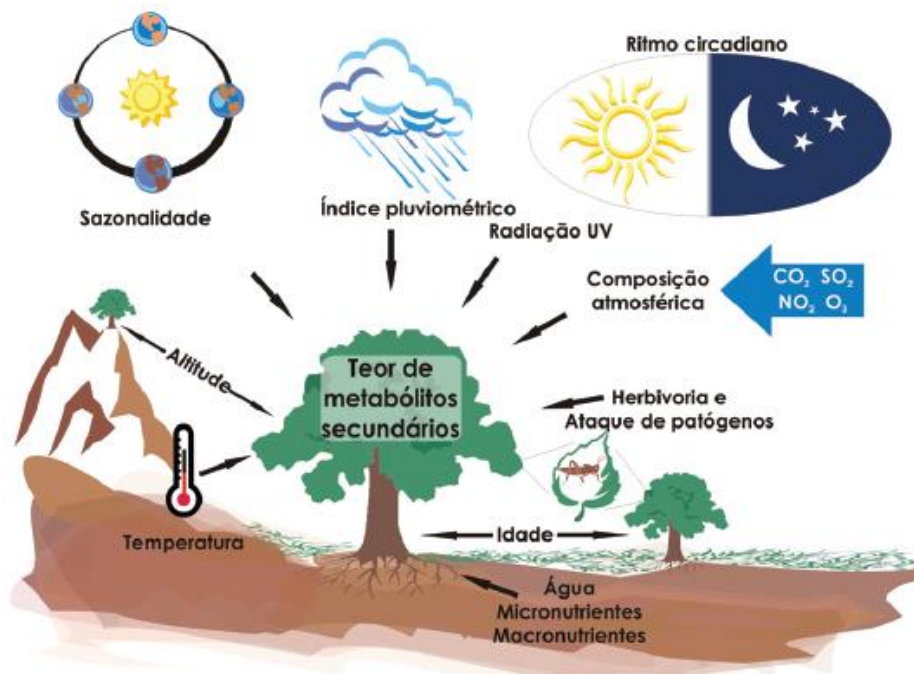
Fonte: adaptado de Verma; Shukla, 2015

#### 2.2.2.4 Fatores ambientais

Os Fatores ambientais podem interferir com a qualidade e a quantidade de produtos secundários resultantes do metabolismo de um vegetal em determinado momento (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). A seguir, esses fatores são considerados com alguns detalhes.

- **Fatores abióticos:** durante a ontogenia os vegetais interagem com o ambiente e entram em contato com diversos fatores abióticos, como mostra a Figura 6, que influenciam o desenvolvimento e a sobrevivência dos vegetais. Um desequilíbrio entre esses componentes pode causar estresses e conseqüentemente alterar a produção e acúmulo de metabólitos secundários (VERMA; SHUKLA, 2015).

**Figura 6** - Principais fatores ambientais que influenciam a síntese de metabólitos secundários nos vegetais.



Fonte: Gobbo-Neto; Lopez (2007).

- **Fatores bióticos:** os vegetais estão sujeitos a ataques de agentes biológicos, como, fungos, vírus, bactérias, insetos, entre outros, e para se protegerem desses ataques eles utilizam seus alguns dos seus metabólitos secundários que possuem atividades antimicrobianas e inseticidas (TAIZ; ZEIGER, 2012). Conforme Wojakowska *et al.* (2013), durante a defesa contra agentes patogênicos há uma alta concentração de metabólitos secundários, principalmente de compostos fenólicos, desencadeada pela rápida síntese dos mesmos em resposta ao estresse.

## 2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

### 2.3.1 Definição e características dos óleos essenciais

Entre as substâncias sintetizadas pelos vegetais como metabólitos secundários, encontram-se os componentes dos óleos essenciais (OE's) (BAKKALI *et al.*, 2008). Esses óleos são uma mistura lipofílica complexa de metabólitos secundários que podem ser sintetizados por vários

órgãos dos vegetais, como flores, folhas, galhos, raízes, cascas e caule (BURT, 2004; AMORATI *et al.*, 2013), e são armazenados em células secretoras especializadas, como os tricomas glandulares, cavidades e canais secretores (BAKKALI *et al.*, 2008). Adicionalmente, caracterizam-se por serem líquidos a temperatura ambiente, altamente voláteis, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, possuem baixo peso molecular e densidade na maioria das vezes mais baixa que a água, geralmente são lípidos, apresentam forte odor, e normalmente são obtidos por destilação a vapor ou hidrodestilação (BAKKALI *et al.*, 2008; TUREK; STINTZING, 2013).

Eles constituem o que se chama a “essência das plantas”, e geralmente possuem fragrâncias agradavelmente perfumadas (VALGIMIGLI *et al.*, 2012), podendo, portanto, serem usados em quantidades significativas nas indústrias de aromas e perfumes (CALO *et al.*, 2015). De acordo com Turek e Stintzing (2013), os OE's representam uma alternativa promissora nas áreas da nutrição, farmacêutica e campos agrícolas, devido às propriedades que os mesmos apresentam como antisséptico, antimicrobiano, anti-inflamatório, analgésico, sedativo, anestésico local, antiviral, nematicida, antifúngica, inseticida (BAKKALI *et al.*, 2008) e antioxidante (AMORATI *et al.*, 2013).

No entanto, é importante salientar que os OE's são muito instáveis e podem sofrer inúmeras reações de degradação na presença de luz, calor, umidade, oxigênio e metais, o que dificulta a sua conservação e altera propriedades dos mesmos, fazendo com que o processo de armazenamento dos OE's seja fundamental para a manutenção de sua qualidade (GUIMARÃES *et al.*, 2008).

### **2.3.2 Histórico de uso dos óleos essenciais**

Várias espécies vegetais vêm sendo utilizadas, desde a antiguidade, devido as suas propriedades como conservantes, aromas e condimentos (BAUER *et al.*, 2001), além de seus fins medicinais (EDRIS, 2007). As propriedades citadas acima estão relacionadas com a síntese de metabólitos secundários, como os OE's (EDRIS, 2007). Esses óleos foram primeiramente extraídos, há mais de 2000 anos atrás, no leste (Egito, Índia e Persia) utilizando o método de destilação, que foi aperfeiçoado no século IV pelos Arábes (BAUER *et al.*, 2001).

Por sua vez, no início do século XIV a extração e uso de OE's foram devidamente descritos por Arnald de Villanova (1311- 1235 a.C.), um físico catalão que descreveu os óleos de

alecrim, sálvia e terebintina em seu livro ‘Opera Omnia’. A partir de então, os efeitos farmacológicos dos óleos passaram a ser descritos nas farmacopéias (BAUER *et al.*, 2001).

Adicionalmente, no século XVI o médico e alquimista Suíço, Paracelsus Von Hohenheim, nomeou o componente ativo de uma droga de ‘Quinta essencial’, expressão que deu origem ao termo ‘Óleo essencial’. Já, no século XVII, segundo o francês Ernest Duchesne, a extração dos OE’s era bem conhecida e as farmácias comercializavam cerca de 20 óleos diferentes (BURT, 2004). Além disso, o uso de OE’s com finalidades medicinais foi documentado desde a colonização da Austrália, no século XVIII, porém provavelmente os óleos já eram utilizados, com os mesmos fins, pelos aborígenes (australianos nativos). Acredita-se que os primeiros ensaios de atividade antibacteriana utilizando OE’s foram realizados por volta do ano 1880. Porém, no século XX o uso medicinal dos OE’s caiu gradualmente em relação a sua utilização como perfumes e condimentos (BURT, 2004).

Atualmente, existem várias pesquisas sobre OE’s, sua composição química, aplicações na biotecnologia, aromaterapia e avaliação das atividades biológicas tanto dos OE’s quanto dos componentes majoritários, como por exemplo, atividades antimicrobiana (PEIXOTO *et al.*, 2013), inseticida, larvicida (LIMA *et al.*, 2013), antinociceptiva (XIMENES *et al.*, 2013), antioxidante (AMORATI *et al.*, 2013), anti-inflamatória (RAMOS *et al.*, 2013), antitumoral (LIN *et al.*, 2012), entre outras.

### **2.3.3 Composição química dos óleos essenciais**

Quimicamente os OE’s consistem, geralmente, em terpenos (monoterpenos, sequiterpenos e diterpenos), álcoois, ácidos, ésteres, epóxidos, aldeídos, cetonas, aminas e sulfetos (CALO *et al.*, 2015). Segundo Bakkali *et al.* (2008), os componentes desses óleos podem ser divididos em dois grupos de origens biosintéticas distintas: (i) terpenos, e (ii) constituintes aromáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular (Figura 7).

No entanto, eles são normalmente caracterizados por dois ou três componentes majoritários, com concentrações bastante elevadas em comparação com outros componentes presentes nos óleos em quantidades vestigiais. Por exemplo, os componentes majoritários do óleo essencial de *Origanum compactum* são carvacrol e timol com 30% e 27% de incidência,

respectivamente (BAKKALI *et al.*, 2008). Geralmente, esses componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos OE's (PICHERSKY *et al.*, 2006).

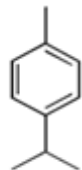
**Figura 7** - Estrutura química dos componentes dos óleos essenciais.

## 1. Terpenos

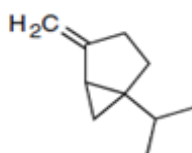
### -Monoterpenos

#### Carboneto monocíclico

Cimeno y

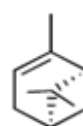


Sabineno

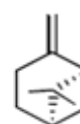


#### Carboneto bicíclico

Alfa-pineno

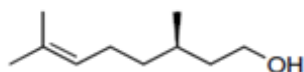


Beta-pineno

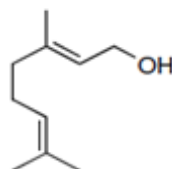


#### Álcool acíclico

Citronelol

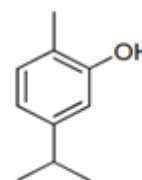


Geraniol

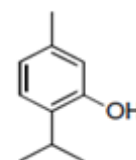


#### Fenol

Carvacrol



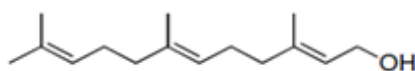
Timol



### -Sesquiterpenos

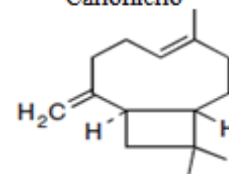
#### Carboneto

Farnesol



#### Álcool

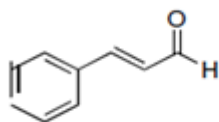
Cariofileno



## 2. Compostos aromáticos

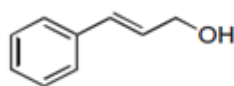
### Aldeído

Cinamaldeído



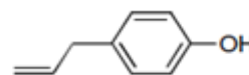
### Álcool

Álcool de cinamilo

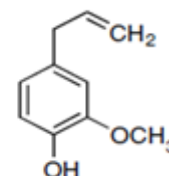


### Fenol

Chavicol

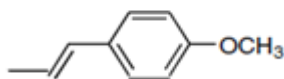


Eugenol

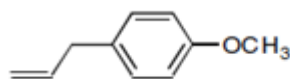


### Derivados de metoxi

Anetol

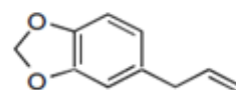


Metil chavicol



### Derivados de dioximetileno

Safrol



Fonte: adaptado de Bakkali *et al.* (2008).

É importante ressaltar que a composição química dos OE's é determinada geneticamente, no entanto, ela pode ser modificada por vários fatores, como origem botânica, parte do vegetal, quimiotipo, método de extração, fatores ambientais, procedimento de cultivo das plantas, forma de secagem, época de colheita, tipo de adubação, entre outros. Portanto, para obter OE's de composição padronizada, eles devem ser extraídos utilizando o mesmo método, sob as mesmas condições, do mesmo órgão da planta, que tenha crescido no mesmo solo, sob o mesmo clima e colhido na mesma estação (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; BAKKALI *et al.*, 2008).

A identificação química dos componentes dos OE's é realizada usualmente a partir de métodos cromatográficos acoplados a modos de detecção. Esses métodos também permitem a detecção de impurezas e de reações de degradação. O método cromatográfico mais empregado atualmente para identificar as substâncias desses metabólitos secundários é a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). No entanto, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) também se mostrou sensível e versátil para a detecção de óleos essenciais voláteis, bem como, de substâncias menos voláteis (TUREK; STINTZING, 2013).

#### **2.3.4 Métodos de extração dos óleos essenciais**

Os OE's podem ser obtidos por diferentes métodos de extração e é importante ressaltar que as propriedades dos OE's dependem do método de extração utilizado. Sendo assim, o método empregado na extração de um óleo pode alterar suas características químicas, uma vez que, o calor e pressão utilizados durante a extração podem interferir na qualidade final do óleo (OKOH *et al.*, 2010).

Esses métodos podem ser classificados em duas categorias: convencionais/ métodos clássicos e inovadores/ métodos avançados. Os métodos convencionais são normalmente baseados na destilação por aquecimento, sendo exemplos de métodos convencionais: hidrodestilação, arraste a vapor, extração com solventes orgânicos, prensagem a frio e enfloração. No entanto, existem algumas vantagens relacionadas aos métodos convencionais, como a termolabilidade dos componentes dos OE's que podem sofrer alterações químicas (hidrólise, isomerização, oxidação) devido a altas temperaturas. Por isso, é importante controlar a temperatura e o tempo de extração dos OE's (ASBAHANI *et al.*, 2015).



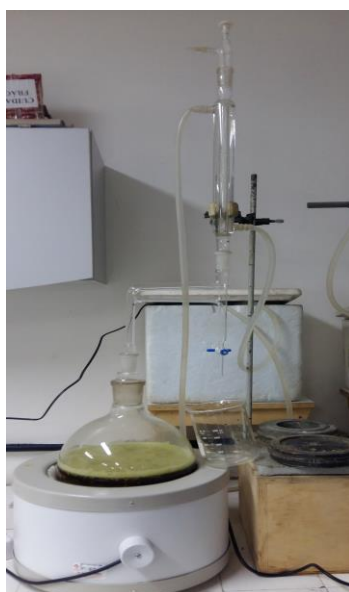
Já os métodos inovadores tem a finalidade de reduzir o tempo de extração, consumo de energia, uso de solvente, emissões de CO<sub>2</sub>, além de ter a maior probabilidade de conservar a composição química dos OE's. São exemplos de métodos inovadores: extração por fluido supercrítico e subcrítico, extração assistida por ultrassom e por micro-ondas, entre outros (ASBAHANI *et al.*, 2015).

Abaixo será explanado, de modo geral, os exemplos citados de métodos de extração concencionais e inovadores.

#### 2.3.4.1 Hidrodestilação

A hidrodestilação é um método convencional para a extração de compostos bioativos e OE's de plantas. Neste método não há a utilização de solventes orgânicos (AZMIR *et al.*, 2013). Além disso, de acordo com Asbahani e colaboradores (2015), a hidrodestilação é o método tradicional menos complexo utilizado na extração de OE's. Nele o material vegetal é aquecido junto com água destilada dentro de um balão de vidro e o vapor, proveniente do aquecimento do material e da água, passa por um condensador e a mistura de água e óleo, previamente condensada, vai para um decantador a fim de ser separada por densidade.

**Figura 8** - Hidrodestilador.



#### 2.3.4.2 Arraste a vapor

É um método clássico amplamente utilizado na obtenção de OE's baseado no mesmo princípio da hidrodestilação, contudo, nesse método não há contato direto entre o material vegetal e água (ASBAHANI *et al.*, 2015).

#### 2.3.4.3 Extração com solventes orgânicos

Na extração com solventes orgânicos o material vegetal é imerso em um solvente orgânico, a fim de se extrair os componentes dos OE's. Além do mais, este método evita a alteração dos constituintes químicos dos OE's, uma vez que, nele são utilizadas temperaturas mais amenas, quando comparado à hidrodestilação. No entanto, uma das desvantagens da extração com solvente orgânicos é a possível alteração na fragrância, cor e viscosidade dos óleos, ainda, pode haver resíduos de solventes orgânicos nos óleos, tornando a aplicação alimentar ou farmacêutica destes materiais impossível (ASBAHANI *et al.*, 2015; JAKIEMIU, 2008).

#### 2.3.4.4 Prensagem a frio

A prensagem a frio é um método convencional de extração mecânica utilizado na extração de OE's de frutas cítricas, que são encontrados nos tecidos periféricos, no caso nas cascas (JAKIEMIU, 2008). Durante o processo de extração as frutas são prensadas e delas é extraído tanto o óleo essencial, que anteriormente estava nas glândulas de armazenamento de óleo presente no mesocarpo, quanto o suco. Posteriormente, é feita uma centrifugação com a finalidade de separar o OE puro, que pode ser utilizado nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, e como aromatizante (ASBAHANI *et al.*, 2015).

#### 2.3.4.5 Enfloração

O método de enfloração é utilizado para extração de OE's de matérias-primas delicadas como, por exemplo, as pétalas de flores. Nele, as pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante um determinado tempo. Em seguida, as pétalas

esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. O álcool então é destilado a baixa temperatura, obtendo-se assim o OE (JAKIEMIU, 2008).

#### 2.3.4.6 Extração por fluido supercrítico

A extração por este método baseia-se no princípio do uso e reciclagem de um solvente, no estado supercrítico, em processos repetidos de compressão e decompressão. Por aumento na pressão e temperatura o solvente atinge o ponto supercrítico, em seguida, ele passa pelo material a ser extraído e carrega materiais voláteis. Esse processo é seguido por um passo de decompressão, onde o produto extraído pelo solvente é encaminhado para separadores, no qual o fluido extrator é gradualmente descomprimido, a fim de separar o material extraído do solvente utilizado na extração (FORNARI *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que o dióxido de carbono é o solvente mais empregado nesta metodologia, devido a algumas vantagens como: (i) ponto crítico é facilmente atingido (Pressão Crítica (PC): 72.9 atm e Temperatura Crítica (TC): 31,2°C), (ii) não causa danos às moléculas termolábeis presentes no material a ser extraídos, (iii) é quimicamente inerte e não tóxico, (iv) não inflamável, (v) pureza elevada com custos relativamente baixos, entre outras (POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Em adição, os OE's obtidos por fluido supercrítico, geralmente, possuem qualidade superior em comparação aos óleos obtidos por métodos clássicos. No entanto, os custos elevados, as instalações e a manutenção dos equipamentos ainda são um grande obstáculo para a ampla utilização deste método (ASBAHANI *et al.*, 2015).

#### 2.3.4.7 Extração por fluido subcrítico

O estado subcrítico é atingido quando a pressão é maior que a PC, mas a temperatura é inferior a TC, ou inversamente. Nesse estado, a água e o dióxido de carbono são solventes mais empregados nesta metodologia para a extração de OE's (ASBAHANI *et al.*, 2015).

De acordo com Ayala e Castro (2001), a extração por fluidos subcríticos é uma poderosa alternativa para a obtenção de OE's, uma vez que, a mesma permite uma rápida extração utilizando baixas temperaturas, evitando assim a degradação dos compostos voláteis e

termolábeis. Além disso, este método causa baixo impacto ambiental e tem menor custo quando comparado à extração por fluídos supercríticos.

#### 2.3.4.8 Extração assistida por ultrassom

Nesta metodologia, o material vegetal é imerso em água ou em um solvente e, ao mesmo tempo é submetido à ação de ultrassons. Essas ondas de ultrassom induzem a vibração mecânica das paredes e membranas dos vegetais e isso acarreta a rápida liberação dos OE's (ASBAHANI *et al.*, 2015).

Em comparação com os métodos tradicionais de extração, a extração assistida por ultrassom melhora a eficiência e a taxa de extração, além de reduzir a temperatura do processo. Adicionalmente, os equipamentos são relativamente simples e baratos quando comparado com outros métodos inovadores de extração, como extração por fluídos supercríticos e extração assistida por micro-ondas (ASBAHANI *et al.*, 2015).

#### 2.3.4.9 Extração assistida por micro-ondas

A utilização da extração assistida por micro-ondas tornou-se rapidamente um dos métodos mais potentes e promissores de extração de OE's, devido a sua alta reprodutibilidade, curto tempo de extração, manipulação simplificada, redução do consumo de solvente e energia (ASBAHANI *et al.*, 2015).

### 2.3.5 Importância ecológica e econômica dos óleos essenciais

Uma das principais funções ecológicas dos OE's, assim como de outros metabólitos secundários, é proteger o vegetal contra o ataque de patógenos. Devido a essas propriedades de defesa, os OE's são alternativas para uso como pesticidas de origem vegetal, com a finalidade de minimizar os danos ecológicos (BAKKALI *et al.*, 2008). Em adição, os OE's são importantes na reprodução das plantas, uma vez que, o aroma e sabor dos mesmos podem atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes, atuando assim no ciclo de vida do vegetal (BAKKALI *et al.*, 2008).

Além da importância ecológica os OE's também são importantes na economia, em virtude das suas aplicações nas indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêuticas, entre outras. Segundo Bakkali *et al.* (2008), os OE's e seus compostos são utilizados na fabricação de perfumes, maquiagens, aditivos alimentares, produtos sanitários e agrícolas. Como por exemplo, o d-limoneno, acetato de geranilo e d-carvona, componentes de alguns OE's, são empregados na fabricação de perfumes, cremes, sabonetes e fragância para produtos de limpeza. Adicionalmente, alguns óleos são empregados na aromaterapia, que auxilia no relaxamento, redução de dores e ainda pode auxiliar no combate a infecções (BUCKLE, 2015), devido a propriedades antimicrobianas presentes em alguns OE's.

Em virtude de alguns OE's possuírem propriedades repelentes, outro importante uso desses óleos é na fabricação de repelentes aplicados sobre a pele (BAKKALI *et al.*, 2008). Essas propriedades estão associadas à presença de alguns monoterpenos e sesquiterpeno, como  $\alpha$ -pineno, limoneno, terpinoleno, citronelol, citronelal, timol e  $\beta$ -cariofileno (GILLIJ *et al.*, 2008).

## 2.4 FAMÍLIA EUPHORBIACEAE

A família Euphorbiaceae é composta por cerca de 334 gêneros e mais de 8.000 espécies, que estão distribuídas especialmente nos trópicos, nos mais variados tipos de vegetação e habitats (MWINE; DAMME, 2011). Adicionalmente, é considerada umas das maiores e diversificadas famílias de Angiospermas (SECCO *et al.*, 2012).

Ela compreende gêneros de grande importância econômica e com grande potencial de pesquisa, como *Hevea*, *Manihot*, *Ricinus* e *Croton*. São exemplos de espécies dos gêneros citados acima: *Hevea brasiliensis*, conhecida popularmente como seringueira, *Manihot esculenta*, conhecida como mandioca, aipim, macaxeira e cassava (SECCO *et al.*, 2012), e *Ricinus communis*, conhecida como mamona (MWINE; DAMME, 2011). Em adição, o gênero *Croton* é um dos mais estudado devido a seus compostos biologicamente ativos (SECCO *et al.*, 2012).

### 2.4.1 Gênero *Croton*

*Croton* é o maior e mais diverso gênero da família Euphorbiaceae e compreende cerca de 1.300 espécies de árvores, arbustos e ervas que são amplamente distribuídas em regiões tropicais

(SANTOS *et al.*, 2014; LIMA; PIRANI, 2008). No Brasil, aproximadamente 356 espécies de *Croton* foram descritas e elas têm sido reportadas na Caatinga, Campos Rupestres, Campos Sulinos, Cerrado, Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Campos de Altitude e Restingas (SECCO *et al.*, 2012). Por sua vez, de acordo com Silva *et al.* (2010), 35 espécies de *Croton* ocorrem no estado de Pernambuco e a maior parte delas têm distribuição exclusiva da Caatinga.

Adicionalmente, algumas de suas espécies são pioneiras na colonização de locais perturbados, tais como beira de estradas, margem de rios e clareiras de matas. Essa característica torna as espécies deste gênero fortes candidatas na restauração de áreas degradadas (LIMA; PIRANI, 2008).

Em adição, algumas delas são empregadas na medicina tradicional para tratar diversas enfermidades, como malária, inflamação, diabetes, câncer, infecção urinária, hipertensão, entre outras (BLOCK *et al.*, 2004; SALATINO *et al.*, 2007). São exemplos de espécies usadas na medicina popular *C. cajucara*, conhecida como ‘sacaca’, que é utilizada no tratamento de diabetes, colesterol alto e distúrbios gastrointestinais; e *C. celtidifolius*, conhecida como ‘sangue-de-adave’, que é usada popularmente no tratamento de úlceras, reumatismo, leucemia e inflamações. Em adição, o gênero *Croton* possui forte potencial econômico, pois suas espécies são ricas em diversos metabólitos secundários com atividades biológicas, como terpenos e alcaloides. Além disso, algumas delas são aromáticas, indicando a presença de OE’s (SALATINO *et al.*, 2007).

#### 2.4.1.1 Composição química dos óleos essenciais do gênero *Croton*

De acordo com Salatino e colaboradores (2007), os OE’s das espécies do gênero *Croton* são constituídos usualmente por terpenos (mono e sesquiterpenos) e fenilpropanóides. Entre os monoterpenos,  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, linalool e 1,8-cineol são frequentemente encontrados. Por sua vez, os sesquiterpenos mais frequentes são  $\beta$ -cariofileno e germacreno D. Já entre os fenilpropanóides, o metileugenol é mais comum.

Na Tabela 2 é possível observar os componentes majoritários dos OE’s das folhas de algumas espécies do gênero *Croton*.

**Tabela 2** - Composição química dos óleos essenciais obtidos das folhas de algumas espécies do gênero *Croton*.

<b>Espécies</b>	<b>Componentes majoritários</b>	<b>Referência</b>
<i>Croton adamantinus</i>	Metil-eugenol (14,81%), 1,8-Cineol (13,74%) e ( <i>E</i> )-cariofileno (5,80%).	XIMENES <i>et al.</i> , 2013
<i>C. argyrophylloides</i>	$\beta$ -guaiano (37,51%) e $\alpha$ -pineno (15,76%)	LIMA <i>et al.</i> , 2013
<i>C. argyrophyllus</i>	Biciclogermacreno (14,60%), espatulenol (8,27%), ( <i>E</i> )-cariofileno (6,79%), $\beta$ -elemeno (6,19%), $\beta$ -felandreno (5,75%), mirceno (4,81%), e óxido de cariofileno (3,68%)	RAMOS <i>et al.</i> , 2013
<i>C. cajucara</i>	7-Hidroxicalameneno (37,5 - 30,9%) linalool (13,2 - 6,3%), ( <i>E</i> )-cariofileno (5,7 - 2,6), $\alpha$ -pineno (24,7 - 0,1%)	AZEVEDO <i>et al.</i> , 2013
<i>C. campestris</i>	1,8-Cineol (17,0%), biciclogermacreno (16,2%) e limoneno (9,7%)	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2013
<i>C. conduplicatus</i> ( <i>C. heliotropiifolius</i> )	1,8-cineol (16,76 - 18,99%), $\alpha$ -felandreno (8,73 - 13,47%), biciclogermacreno (5,51 - 13,76%), ( <i>E</i> )-cariofileno (6,95 - 9,75%) e espatulenol (3,98 - 7,80%)	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2014
<i>C. cordifolius</i>	1,8-Cineol (25,09%) e $\alpha$ -felandreno (15,43%)	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2015
<i>C. ericoides</i>	$\beta$ -pineno (39,0%), ( <i>E</i> )-cariofileno (8,1%) e linalool (7,6%)	VUNDA <i>et al.</i> , 2012
<i>C. heliotropiifolius</i>	( <i>E</i> )-cariofileno (35,82%), biciclogermacreno (19,98%) e germacreno D (11,85%)	DÓRIA <i>et al.</i> , 2010
<i>C. isabelli</i>	Biciclogermacreno (48,9%), ( <i>E</i> )-cariofileno (14,3%) e germacreno D (12,6%)	VUNDA <i>et al.</i> , 2012

**Tabela 2** - Composição química dos óleos essenciais obtidos das folhas de algumas espécies do gênero *Croton* (Continuação).

<b>Espécies</b>	<b>Componentes majoritários</b>	<b>Referência</b>
<i>C. lechleri</i>	Sesquicineol (17,29%), $\alpha$ -calacoreno (11,29%), 1,10-di-epi-cubenol (4,75%), $\beta$ -calacoreno (4,34%), limoneno (4,20%) e epicedrol (4,09%)	ROSSI <i>et al.</i> , 2011
<i>C. matourensis</i>	Acetato de fenchilo (19,5%), metil-eugenol (14,2%), isoelomicina (11,3%) e valenceno (5,8%)	COMPAGNONE <i>et al.</i> 2010
<i>C. micans</i>	Acetato de fenchilo (25,3%), $\alpha$ -cariofileno (20,7%) e $\alpha$ -selineno (12,8%)	COMPAGNONE <i>et al.</i> 2010
<i>C. nepetifolius</i>	Metil-eugenol (44,34%) e $\alpha$ -copaeno (10,85%)	LIMA <i>et al.</i> , 2013
<i>C. pallidulus</i>	Terpinen-4-ol (13,6%), ( <i>E</i> )-cariofileno (11,5%), <i>tau</i> -cadinol (7,8%), germacreno D (7,6%) e <i>epi</i> -globulol (6,6%)	VUNDA <i>et al.</i> , 2012
<i>C. pulegiodorus</i>	( <i>E</i> )-cariofileno (20,96%), biciclogermacreno (16,89%), germacreno D (10,55%) e cadinol (4,56%)	DÓRIA <i>et al.</i> , 2010
<i>C. pullei</i>	Linalool (24,90%), $\alpha$ -pineno (8,08%) e $\beta$ -pineno (6,63%)	PEIXOTO <i>et al.</i> , 2013
<i>C. rhamnifolioides</i> ( <i>C. heliotropiifolius</i> )	$\alpha$ -felandreno (12,83 - 8,37%), 1,8-cineol (18,61 - 7,24%) e sesquicineole (16,79 - 1,77%)	SANTOS <i>et al.</i> , 2014
<i>C. sonderianus</i>	Espatuleno (38,32%), ( <i>E</i> )-cariofileno (13,26%) e 1,8-Cineol (7,59%)	LIMA <i>et al.</i> , 2013
<i>C. zehntneri</i> ( <i>C. grewioides</i> )	Trans-anetol (87,5%)	CAVALCANTI <i>et al.</i> , 2012



#### 2.4.1.2 Atividades biológicas dos óleos essenciais do gênero *Croton*

Os OE's das espécies do gênero *Croton* possuem diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, inseticida, antinoceptiva, entre outras. A seguir estão expostas algumas delas.

##### Atividades antibacteriana e antifúngica:

Almeida *et al.* (2013) avaliaram o potencial antibacteriano e atividade moduladora sobre aminoglicosídeos dos OE's da folha e do caule de *C. campestris* contra bactérias patogênicas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus vulgaris*). Os resultados mostraram que o OE do caule apresentou atividade contra todas as bactérias testadas e a melhor CMI (Concentração mínima inibitória) observada foi de 128 µg/mL, contra *S. aureus*. Por sua vez, o óleo extraído da folha foi ativo apenas frente a *S. aureus* e *E. coli* (CMI de 512 µg/mL). Em relação à atividade moduladora, foi observado sinergismo entre os OE's e os aminoglicosídeos, sendo o melhor resultado obtido para a associação do OE da folha com a tobramicina, onde o óleo potencializou a ação do antibiótico em 57.1%.

Em uma pesquisa realizada por Simionatto *et al.* (2007) com o OE da casca do caule de *C. urucurana* foi possível observar atividade antimicrobiana contra 10 microrganismos, onde *Staphylococcus epidermidis* e *E. coli* foram os mais sensíveis (CMI de 1.25 mg/mL), e *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* os mais resistentes ao óleo (MIC de 10 mg/mL).

Adicionalmente, conforme Azevedo *et al.* (2013) e Alviano *et al.* (2005), o OE de *C. cajucara*, apresentou ação antimicrobiana contra *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mucor circinelloides*, *C. albicans*, *Lactobacillus casei*, *S. aureus*, *Streptococcus sobrinus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Streptococcus mutan* e *Rhizopus oryzae*. Além disso, o linalool, composto majoritário do OE de *C. cajucara* morfotipo branco apresentou efeito antimicrobiano frente a *C. albicans* (CMI de 0.7 µg/mL).

De acordo com Fontenelle *et al.* (2008), o OE de *C. grewoides* (*C. zehntneri*) é efetivo contra *Microsporum canis*, *C. albicans* e *Candida tropicalis*, e os óleos de *C. argyrophyloides* e *C. nepetaefolius* apresentaram atividade apenas para as duas espécies do gênero *Candida*.

### Atividade inseticida:

Os OE's de folha e caule de *C. grewioides* mostraram forte atividade inseticida por fumigação contra *Zabrotes subfasciatus*, um dos principais insetos praga de grãos armazenados, responsáveis por perdas de sementes de feijão no Nordeste do Brasil, com uma CL<sub>50</sub> 4,0 µL/L e 13,7 µL/L, respectivamente (SILVA *et al.*, 2008).

Por sua vez, o OE de *C. heliotropiifolius* apresentou efeito repelente, larvicida e ovicida contra *Tribolium castaneum*, e o OE de *C. pulegiodorus* mostrou atividade larvicida e ovicida e reduziu a taxa instantânea de crescimento desse inseto (MAGALHÃES *et al.*, 2015).

Santos e colaboradores (2014) avaliaram a oviposição e, as atividades larvicida contra o quarto instar da larva de *Aedes aegypti* do OE's (fresco e armazenado por 3 anos) das folhas de *C. heliotropiifolius* (*C. rhamnifolioides*) e de alguns dos seus compostos majoritários ( $\alpha$ -felandreno e 1,8-cineol). Os OE's fresco e armazenado apresentaram atividade larvicida contra o mosquito vetor da dengue CL<sub>50</sub> de  $122,3 \pm 3,7$  e  $89,03 \pm 1,94$  µg/mL, respectivamente. Adicionalmente, o  $\alpha$ -felandreno apresentou forte atividade contra as larvas com uma CL<sub>50</sub> de  $39,3 \pm 1,0$  µg/mL. Por outro lado, o 1,8-cineol não foi eficaz em matar as larvas em concentrações inferiores a 150 µg/mL. Em relação à atividade da tripsina, enzima encontrada no intestino de insetos responsável pela digestão de nutrientes e disponibilização de aminoácidos essenciais, pode-se observar que a atividade desta enzima foi inibida de forma dose-dependente pelo OE. Além disso, os OE's de *C. heliotropiifolius* (*C. rhamnifolioides*) exibiram efeito deterrente na oviposição, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL.

Em uma pesquisa realizada por Lima *et al.* (2013) foi possível observar que os OE's das folhas de *C. argyrophyloides*, *C. nepetaefolius*, *C. sonderianus* e *C. grewioides* (*C. zehntneri*) apresentaram atividade inseticida contra o terceiro instar larval do *A. aegypti* (CL<sub>50</sub> de  $94,6 \pm 3,26$ ,  $66,4 \pm 2,3$ ,  $54,5 \pm 6,4$  e  $26,2 \pm 1,3$  µg/mL, respectivamente), ovos de *A. aegypti* (CO<sub>50</sub> de  $116,2 \pm 18,3$ ,  $141,3 \pm 4,9$ ,  $143,2 \pm 4,3$  e  $45,7 \pm 2,8$  µg/mL, respectivamente), e pupas de *A. aegypti* com 24 horas de idade (CP<sub>50</sub> > 500, > 500,  $494,9 \pm 8,4$  e  $456,6 \pm 17,6$  µg/mL, respectivamente). Apenas os OE's de *C. argyrophyloides* e *C. grewioides* (*C. zehntneri*) exibiram efeito deterrente na oviposição (DO<sub>50</sub> de  $458,0 \pm 53,0$  e  $45,3 \pm 8,0$  µg/mL, respectivamente).

Dória *et al.* (2010) avaliaram atividade larvicida contra *A. aegypti* utilizando OE's de duas espécies do gênero *Croton*, *C. pulegioidorus* e *C. heliotropiifolius*, que apresentaram CL<sub>50</sub> de 159 e 544 µg/mL. Em adição, os OE's de *C. regelianus*, coletados de dois locais diferentes do Ceará, foram altamente eficazes contra o terceiro instar das larvas de *A. aegypti* (CL<sub>50</sub> de 24,22 e 66,74 µg/mL), e essa atividade foi aparentemente associada com o ascaridol, componente majoritário do óleo. Além disso, esse OE e seu componente majoritário também se mostraram moderadamente ativos no ensaio nematicida (TORRES *et al.*, 2008).

#### Atividade antitumoral e citotoxicidade:

Segundo Bezerra e colaboradores (2009), o OE de *C. regelianus* e seu componente majoritário, ascaridol, apresentaram atividade antitumoral, tanto *in vitro*, contra linhagens celulares de leucemia promielocítica humana (HL-60) e glioblastoma humano (SF-295) com CI<sub>50</sub> de 22,2 e 48,0 µg/mL para o óleo e CI<sub>50</sub> 6,3 e 18,4 µg/mL para o ascaridol respectivamente, quanto *in vivo* utilizando sarcoma 180, demonstrando taxas de inibição de 28,1 e 31,8 % para os tratamentos com concentrações de 50 e 100 mg/kg respectivamente, enquanto a taxa de inibição do ascaridol foi de 33,9% com 10 mg/mL. O OE das folhas de *C. flavens* mostrou ser eficaz contra as linhagens de carcinoma de pulmão humano (A-549) e adenocarcinoma de cólon (DLD-1) com CI<sub>50</sub> 27 ± 4 e 28 ± 3 µg/mL (SYLVESTRE *et al.*, 2006).

Compagnone *et al.* (2010) avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de OE's de *C. matourensis* (folha) e *C. micans* (flor e folha) contra 3 linhagens celulares humanas de câncer [adenocarcinoma de cólon (LoVo e X-17 - variante genética de LoVo sem a proteína P53) e carcinoma cervical (HeLa)], e uma normal (fibroblastos). Para o óleo de *C. matourensis* as CI<sub>50</sub> sobre LoVo, HeLa e fibroblastos foram de 36,60, 83,90 e 132,73 µg/mL, respectivamente. Por sua vez, os óleos da flor e folha de *C. micans* apresentaram CI<sub>50</sub> foram de 103,27, 87,91, 50 µg/mL e 445,85, 54,95, 81,28 µg/mL, na mesma ordem. Os 3 óleos foram inativos contra a X-17.

#### Outras atividades:

Em relação à atividade antinociceptiva, pesquisas realizadas por Nogueira *et al.* (2015) e Ximenes *et al.* (2013) com *C. cordiifolius* e *C. adamantinus*, respectivamente, mostram que os

OE's dessas duas espécies apresentaram atividade antinoceptiva em camundongos. O óleo de *C. adamantinus* apresentou atividade cicatrizante e antimicrobiana (XIMENES *et al.*, 2013). Além disso, o OE de *C. grewoides* (*C. zehntneri*) e seu componente majoritário (trans-anetol) também apresentaram atividade cicatrizante (CAVALCANTI *et al.*, 2012) e efeito gastroprotetor em ratos (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 2013). Em um estudo executado por Mota *et al.* (2012) foi possível observar que o OE das folhas de *C. grewoides* (*C. zehntneri*) apresentou atividade antimalárica, tanto *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* (CI<sub>50</sub> de 15,2 µg/mL), quanto *in vivo*, inibindo parcialmente (43 a 50%) o crescimento de *Plasmodium berghei* em camundongos quanto administrado por via oral.

Por sua vez, o OE das folhas de *C. cajucara* morfotipo vermelho, conhecida popularmente como sacaca vermelha, e seu componente majoritário, 7-hidroxicalameneno, foram capazes de inibir, *in vitro*, a forma promastigota de *Leishmania chagasi* (CMI de 250 e 15,6 µg/mL, respectivamente) (RODRIGUES *et al.*, 2013). Do mesmo modo, o morfotipo branco, sacaca branca, e seu componente majoritário, linalool, apresentaram atividade leishmanicida contra as fases promastigota e amastigota (DL<sub>50</sub> de 8,3, 4,3, 22,0 e 15,5 ng/mL, respectivamente) (ROSA *et al.*, 2003).

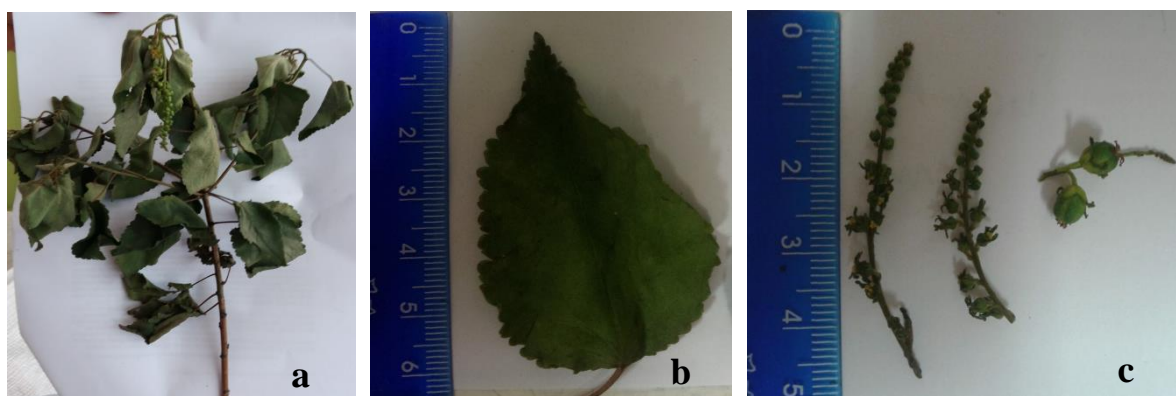
A atividade amebicida dos OE's de *C. ericoides*, *C. isabelli* e *C. pallidulus* foi analisada por Vunda e colaboradores (2012), que concluíram que o OE de *C. ericoides* foi o mais ativo matando 87% dos trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* a uma concentração de 0,5 mg/mL. Por sua vez, o OE de *C. pallidulus* matou 29% dos trofozoítos na mesma concentração, já o *C. isabelli* apresentou a menor atividade amebicida, matando apenas 4% dos trofozoítos a uma concentração de 10 mg/mL.

#### 2.4.1.3 *Croton rudolphianus*

*Croton rudolphianus* (Figura 9), popularmente conhecido como velame-branco, é um arbusto endêmico do Brasil pertencente à família Euphorbiaceae e à ordem Malpighiales. Ele é encontrado nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Sergipe, crescendo em vegetação de Caatinga, campos rupestres, Mata Atlântica e sobre solo argiloso com afloramento rochosos (SILVA *et al.*, 2010).

Seus exemplares podem atingir de 0,8 a 1,5 metros de comprimento, apresentam folhas alternas, inflorescência solitária e racemiforme, flores estaminadas e pistiladas que medem 3 - 4 mm e 3 - 5 mm de comprimento, respectivamente, e possuem cápsulas orbicular e amarronzada. As sementes são elipsóides, rugosas e castanhas (SILVA *et al.*, 2010).

**Figura 9** - *Croton rudolphianus* Müller Argoviensis - a. ramos, b. folha, c. inflorescências e fruto.



## 2.5 BIOINSETICIDAS

O uso constante de produtos químicos sintéticos para o controle de insetos, pragas e vetores de doenças, acarreta vários problemas relacionados com o meio ambiente e saúde humana, incluindo envenenamento agudo e crônico, destruição da fauna, rompimento do controle biológico natural e polinização, extensa contaminação das águas subterrâneas, e evolução da resistência a pesticidas na população de insetos (BRAVO *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2011).

Por sua vez, os inseticidas naturais ou bioinseticidas, obtidos a partir de substâncias naturais provenientes de microrganismos e vegetais (DUTTA *et al.*, 2015), representam uma alternativa interessante para a substituição dos inseticidas sintéticos, pois eles são eficazes e causam menos danos ao meio ambiente (LÓPEZ *et al.*, 2011).

Conforme Dutta e colaboradores (2015), os bioinseticidas geralmente afetam apenas a praga-alvo, em contraste com os pesticidas sintéticos, que podem causar danos em um amplo espectro de organismos, como, aves, insetos e mamíferos. Além disso, são biodegradáveis e normalmente são menos tóxicos que os pesticidas convencionais.

É importante ressaltar que algumas substâncias naturais produzidas pelos vegetais estão sendo empregadas como possíveis alternativas para a proteção do meio ambiente e produtos agrícolas (DUTTA *et al.*, 2015), entre elas estão os OE's, que possuem atividades inseticida, repelente e deterrente de oviposição (LIMA *et al.*, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2014) e são ativos contra bactérias e fungos fitopatogênicos (AZEVEDO *et al.*, 2013).

### 2.5.1 Emprego de OE's como bioinseticidas

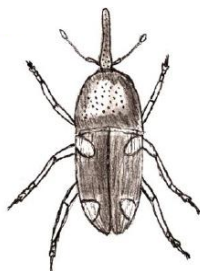
A atividade repelente e inseticida de OE's e alguns de seus compostos majoritários, como 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, timol, citronelal e citronelol,  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, mirceno, linalool, carvacrol, limoneno, mentol, entre outros, foram descritas para diversos insetos (NICULAU *et al.*, 2013). Além disso, os OE's das seguintes espécies apresentam efeito no controle de pragas: *Cymbopogon winteriana* (capim-lim), *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Vetiveria zizanoides* (vetiver), *Eugenia caryophyllus* (cravo) e *Thymus vulgaris* (tomilho). O óleo de *Mentha piperita* (hortelã) mostrou efeito repelente contra formigas, moscas, piolhos e mariposas, e *Mentha pulegium* (poejo) contra pulgas, formigas, piolhos, mosquitos, carrapatos e mariposas (VENTUROSOSO *et al.*, 2011).

Os OE's de algumas espécies do gênero *Croton* apresentaram atividade inseticida contra larvas do mosquito vetor da dengue, como *C. argyrophylloides*, *C. nepetaefolius*, *C. sonderianus* e *C. grewioides* (*C. zehntneri*) (LIMA *et al.*, 2013) e *C. heliotropiifolius* (SANTOS *et al.*, 2014).

### 2.6 *Sitophilus zeamais*

*Sitophilus zeamais* Motschulsky (Figura 10), conhecido popularmente como gorgulho do milho, pertence à Ordem Coleoptera e à Família Curculionidae, é um inseto praga do milho que também pode atacar outros hospedeiros, como trigo, sorgo, arroz e cereais, além de produtos alimentícios processados, como massas e biscoitos (FAZOLIN *et al.*, 2010), provocando desvalorização comercial, perda no valor nutritivo e diminuição no poder germinativo de sementes (LORINI, 2003). Além disso, esses insetos foram descritos atacando frutas, onde eles perfuram as mesmas facilitando a proliferação de microrganismos fitopatogênicos, contribuindo para a podridão do fruto e depreciação da qualidade de seus produtos finais.

**Figura 10.** Desenho representativo de *Sitophilus zeamais* Motschulsky.



Fonte: Napoleão *et al.* (2015)

Em relação a sua distribuição geográfica, eles podem ser encontrados em regiões tropicais e subtropicais (WAKEFIELD *et al.*, 2005), e seu ciclo de vida ocorre entre 4 e 5 semanas, no qual as fêmeas colocam em média 280 ovos (MARSARO *et al.*, 2005). As larvas e pulpas apresentam coloração amarelo-clara e branca, respectivamente. Além disso, os adultos são castanho-escuros com machas avermelhadas e apresentam a cabeça projetada para frente na forma de rostro curvado (WAKEFIELD *et al.*, 2005).

*S. zeamais* é considerado uma das principais pragas primárias de grãos armazenados no Brasil, uma vez que, os insetos desta espécie possuem elevada capacidade de infestação cruzada e penetração nos grãos, além de atacar um grande número de hospedeiros. Em relação aos danos agrícolas, o *S. zeamais*, junto com outros insetos pragas de grãos armazenados, provocam uma perda aproximada de 24,5% no cultivares de milho (NAPOLEÃO *et al.*, 2015).

Por sua vez, o controle de *S. zeamais* está relacionado com algumas medidas que compreendem limpeza e secagem dos grãos, manutenção da aeração e controle da temperatura, além do uso de inseticidas sintéticos, como malathion, deltametrina e fosfina, que normalmente são aplicados por fumigação (LAZZARI *et al.*, 2006; VINHA *et al.*, 2011).

Entretanto, o uso desses inseticidas podem causar intoxicações aos aplicadores, presença de resíduos tóxicos nos grãos, atacar insetos não alvo, além de resultar no surgimento de populações de insetos resistentes (LORINI, 2003; BENHALIMA *et al.*, 2004). Por isso, é fundamental a avaliação de produtos naturais com atividade inseticida, como OE's, extratos vegetais, lectinas, entre outros.

### 2.6.1.1 Emprego de OE's no controle de *Sitophilus zeamais*

Os OE's das folhas de *Artemisia capillaris* e *A. mongolica* apresentaram efeito fumigante contra *S. zeamais* adultos (CL<sub>50</sub> de 5,31 e 7,35 µg/mL, respectivamente). Além disso, esses óleos também mostraram toxicidade por contato com DL<sub>50</sub> de 105,95 e 87,92 µg/adulto (LIU *et al.*, 2010). Por sua vez, os OE's das flores de *A. giraldii* e *A. subdigitata* possuem efeito fumigante frente ao gorgulho do milho com CL<sub>50</sub> de 6,29 e 17,01 mg/L de ar, além de toxicidade por contato (DL<sub>50</sub> de 40,51 e 76,34 µg/adultos) (CHU *et al.*, 2012)

O OE de *Dahlia pinnata* apresentou tanto toxicidade por contato (DL<sub>50</sub> de 132,48 e 828,79 mg/cm<sup>2</sup>), quanto toxicidade por fumigação (CL<sub>50</sub> de 14,10 e 73,46 mg/L) contra *S. zeamais* e *Sitophilus oryzae* (WANG *et al.*, 2015). Já o óleo da inflorescência de *Alpinia purpurata* exibiu apenas ação fumigante frente a esse inseto praga com CL<sub>50</sub> de 41,4 µL/L de ar (LIRA *et al.*, 2015).

Em um estudo realizado por Torres *et al.* (2014), foi possível mostrar que o OE de *Laurelia sempervirens* apresentou atividade inseticida por contato (CL<sub>50</sub> de 2,3 mL de OE/ Kg de grãos) e por fumigação (CL<sub>50</sub> de 177 µL/L de ar) contra *S. zeamais*.

Paes *et al.* (2012) avaliaram a ação fumigante do OE de mostarda nas fases de desenvolvimento do gorgulho do milho (ovos, larvas de terceiro instar, pupa e adultos), e o seu efeito na qualidade dos grãos de milho. Eles concluíram que o óleo de mostarda na concentração de 1,25 µL/L causou mortalidade em todos os estágios de *S. zeamais*; no entanto os ovos foram, significativamente, mais tolerantes que os outros estágios de desenvolvimento (TL<sub>50</sub> de 16,72 h e TL<sub>95</sub> 32,82 h), seguido de pupa (TL<sub>50</sub> de 16,39 h e TL<sub>95</sub> 38,70 h) e adultos (TL<sub>50</sub> de 7,01 h e TL<sub>95</sub> 38,70 h). As larvas por sua vez foram menos tolerantes ao óleo (TL<sub>50</sub> de 6,19 h e LT<sub>95</sub> 29,27 h). Além disso, a fumigação nos grãos de milho com o OE de mostarda não afetou o seu teor de umidade e germinação.

## 2.7 MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS

Microrganismos fitopatogênicos invadem os tecidos da planta hospedeira e retiram os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento (BATISTA *et al.*, 2007), causando vários danos às culturas, tais como, (i) lesões nos órgãos de reserva, frutos, caule, raízes e sistema vascular (xilema), (ii) tombam plântulas ou plantas bem desenvolvidas, (iii) e ainda, dependendo



da intensidade da doença, levam as plantas à morte. Em adição, esses danos propiciam queda na produção e, conseqüentemente, prejuízos financeiros para os produtores, com reflexo no preço final dos produtos (BUENO; FISCHER, 2006).

As bactérias fitopatogênicas, em condições ambientais favoráveis, podem constituir fator limitante à exploração econômica de plantas, tanto pela alta incidência e severidade em culturas de valor econômico, quanto pela facilidade com que se disseminam. Essas bactérias se reproduzem rapidamente e são transmitidas do solo para as plantas e de planta para planta pela água de irrigação, tratos culturais ou trânsito de pessoas, podendo sobreviver no solo, resto de culturas e em plantas contaminadas (ALMEIDA, 2006). As bactérias fitopatogênicas necessitam de um ferimento ou de uma abertura natural para poder penetrar na planta, além de condições ambientais favoráveis para causar doença. Os principais sintomas causados por essas bactérias são: anasarca ou encharcamento, mancha, podridão mole, murcha, hipertrofia, cancro, morte das pontas e canela preta (MICHEREFF, 2001).

Alguns exemplos de bactérias que causam importantes doenças em plantas no Brasil são: *Acidovorax citrulli*, *Pectobacterium carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas campestris*. A bactéria *A. citrulli* é o agente causal da mancha-aquosa em curcubitáceas, tais como melão, melancia, abóbora. Os sintomas dessa doença apresentam-se na forma de lesões nas plântulas (podendo causar tombamento e morte), folhas, ramos e frutos (MELO *et al.*, 2014). No Brasil, esse patógeno foi relatado causando manchas em frutos de melancia, no estado de São Paulo, e em meloeiro nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (NASCIMENTO *et al.*, 2004). Por sua vez, *P. carotovorum* tem a capacidade de provocar podridão mole ou canela preta em vários vegetais, além de produzirem enzimas pectolíticas. Esse patógeno pode ocorrer em campos de produção e gerar severos danos em pós-colheita (CARVALHO FILHO; MELLO, 2008).

*R. solanacearum* causa murchas nas culturas de batata, eucalipto e tomate e é considerada uma importante doença nas regiões de clima tropical e subtropical. Essa bactéria sobrevive no solo e pode ser transmitida por sementes (LOPES; QUEZADO-DUVAL, 2007). Segundo Almeida (2006), a murcha ocorre pela obstrução dos feixes vasculares, devido à invasão e/ou colonização da bactéria fitopatogênica, impedindo ou dificultando o transporte de água e nutrientes. *X. campestris* pode causar diversas doenças em várias culturas vegetais, como a

podridão negra das crucíferas, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, e cancro-bacteriano, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (MICHEREFF, 2001).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química do óleo essencial (OE) extraídos das folhas de *Croton rudolphianus* e seu potencial inseticida e atividade antimicrobiana contra pragas agrícolas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o OE das folhas de *Croton rudolphianus* utilizando o método de hidrodestilação, bem como, quantificar e identificar os compostos químicos no OE usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM);
- Avaliar a toxicidade do OE das folhas de *C. rudolphianus* contra *Sitophilus zeamais* adultos por ingestão, contato e fumigação;
- Avaliar o efeito repelente do OE das folhas de *C. rudolphianus* contra *S. zeamais* adultos;
- Determinar o potencial antimicrobiano do OE das folhas de *C. rudolphianus* frente a seis bactérias fitopatogênicas.

## REFERÊNCIAS

ACHAKZAI, A. K. K.; ACHAKZAI, P.; MASOOD, A.; KAYANI, S. A.; TAREEN, R. B. Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in Quetta. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 5, p. 2129-2135, 2009.

ALMEIDA, I. M. G. **Importância de bactérias fitopatogênicas em plantas ornamentais e seu controle**. In: XIV Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico. 2006, Pariquera-Açu, SP. Anais XIV Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico, pp. 7-12, 2006.

ALMEIDA, J.; SOUZA, A. V.; OLIVEIRA, A. P.; SANTOS, U.; SOUZA, M.; BISPO, L.; TURATTI, Z. C.; LOPES, N. Chemical Composition of Essential Oils from *Croton conduplicatus* (Euphorbiaceae) in Two Different Seasons, **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n. 6, p. 1137-1145, 2014.

ALMEIDA, T. S.; ROCHA, J. B. T.; RODRIGUESA, F. F. G.; CAMPOS, A. R. C.; COSTA, J. G. M. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 630-633, 2013.

ALVIANO, W. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, D. S.; BIZZO, H. R.; SOUTO-PADRÓN, T.; RODRIGUES, M. L.; BOLOGNESE, A. M.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, M. M. G. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, p. 101-105, 2005.

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835-10847, 2013.

ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. H. A.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A.

Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 2015.

AYALA, R. S.; CASTRO, M. D. L. Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. **Food Chemistry**, v. 75, n. 1, p. 109-113, 2001.

AZEVEDO, M. M. B.; CHAVES, F. C. M.; ALMEIDA, C. A.; BIZZO, H. R.; DUARTE, R. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. Antioxidant and Antimicrobial Activities of 7-Hydroxycalamenene- Rich Essential Oils from *Croton cajucara* Benth. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1128-1137, 2013.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARTON, K. E. Early ontogenetic patterns in chemical defense in *Plantago* (Plantaginaceae): genetic variation and trade-offs. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 1, p. 56-66, 2007.

BATISTA, T. F. C.; ALVES, K. F.; SANTOS-FILHO, B. G.; RODRIGUES, R. C.; OLIVEIRA, F. C.; TAVARES, A. E. B. Ocorrência de fungos e nematoides fitopatogênicos em áreas reflorestadas pela Petrobrás oriundas da exploração petrolífera no município de Coari, Amazônia; **Revista de Ciências Agrárias**, v. 47, p. 163-171, 2007.

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. **Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses**. Holzminden, Germany: Wiley-VCH, Weinheim, 2001, 300 p.

BENHALIMA, H.; CHAUDHRY, M. Q.; MILLS, K.A; PRICE, N. R. Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. **Journal of Stored Products Research**, v. 40, n.3, p. 241-249, 2004.

BEZERRA, D. P.; FILHO, J. D. B. M.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; PESSOA, O. D.; TORRES, M. C. M.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, F. A.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor Activity of the Essential Oil from the Leaves of *Croton regelianus* and Its Component Ascaridole. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 1224-1231, 2009.

BEZERRA, D. P.; FILHO, J. D. B. M.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; PESSOA, O. D.; TORRES, M. C. M.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, F. A.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor Activity of the Essential Oil from the Leaves of *Croton regelianus* and Its Component Ascaridole. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p.1224-1231, 2009.

BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B., MEERVELT, L.V.; ROZENBERG, R. JIWAN, J. L. H.; LLABRÉS, G.; PAUW-GILLET, M. C.; QUETIN-LECLERCQ. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 8, p. 1165-1171, 2004.

BRASIL (2002). Decreto de 13 de dezembro de 2002: **Cria o Parque Nacional do Catimbau, nos Municípios de Ibirimir, Tupanatinga e Buíque, no Estado de Pernambuco, e dá outras providências**. Brasília, Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Caatinga**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>> Acesso em: 25 de Abril de 2016a.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Parque Nacional do Catimbau**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/o-que-fazemos/visitacao/unidades-abertas-a-visitacao/732-parque-nacional-do-catimbau.html>> Acesso em: 25 de Abril de 2016b.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.

BRUSOTTI, G.; CESARI, I.; DENTAMARO, A.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.87, p. 218-228, 2014.

BUCKLE, J. **Clinical Aromatherapy: Essential oils in healthcare**. 3. ed. Saint Louis: Churchill Livingstone, 2015. 432p.

BUENO, C. J.; FISCHER, I. H. Manejo De Fungos Fitopatogênicos Habitantes Do Solo. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 3, n. 2, 9p, 2006. Disponível em: <[http://www.aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao2006/2006-julho-dezembro/459-manejo-de-fungos-fitopatogenicos-habitantes-dosolo /file.html](http://www.aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao2006/2006-julho-dezembro/459-manejo-de-fungos-fitopatogenicos-habitantes-dosolo/file.html)> Acesso 02 de maio de 2016.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CARVALHO FILHO, R. C.; MELLO, S. C. M. *Pectobacterium carotovorum*: **taxonomia, identificação, sintomatologia, epidemiologia e controle**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. 2008. 17p.

CAVALCANTI, J. M.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DINIZ, L. R. L.; PORTELLA, V. G.; COSTA, C. O.; LINARD, C. F. B. M.; ALVES, K.; ROCHA, M. V. A. P.; LIMA, C. C.; CECATTO, V.

M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 240-247, 2012.

CAVALCANTI, J. M.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DINIZ, L. R. L.; PORTELLA, V. G.; COSTA, C. O.; LINARD, C. F. B. M.; ALVES, K.; ROCHA, M. V. A. P.; LIMA, C. C.; CECATTO, V. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 240-247, 2012.

CHU, S. S.; LIU, Z. L.; DU, S. S.; DENG, Z. W. Chemical Composition and Insecticidal Activity Against *Sitophilus zeamais* of the Essential Oils Derived from *Artemisia giraldii* and *Artemisia subdigitata*. **Molecules**. v. 17, n. 6, p. 7255-7265, 2012.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LAHLOU, S.; BARRETO, J. E. F.; YUMA, M. E. M.; ARICLÉCIO, C. O.; OLIVEIRA, H. D.; CELEDÔNIO, N. R. FEITOSA, R. G. F.; DUARTE, G. P.; SANTOS, C. F.; ALBUQUERQUE, A. A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, p. 288-298, 2013.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LAHLOU, S.; BARRETO, J. E. F.; YUMA, M. E. M.; ARICLÉCIO, C. O.; OLIVEIRA, H. D.; CELEDÔNIO, N. R. FEITOSA, R. G. F.; DUARTE, G. P.; SANTOS, C. F.; ALBUQUERQUE, A. A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, p. 288-298, 2013.

COMPAGNOEL, R. S.; CHAVEZ, K; MATEU, E.; ORSENI, G.; ARVELO, F.; SUÁREZ, A. I. Composition and Cytotoxic Activity of Essential Oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. **Records of Natural Products**, v. 4, n. 2, p. 101-108, 2010.

COMPAGNONE, R. S.; CHAVEZ, K; MATEU, E.; ORSENI, G.; ARVELO, F.; SUÁREZ, A. I. Composition and Cytotoxic Activity of Essential Oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. **Records of Natural Products**, v. 4, n. 2, p. 101-108, 2010.



CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. New York: American Society of Plants Physiologists, 2000, p. 1250-1318.

DOAN, A. T.; ERVIN, G.; FELTON, G. Temporal effects on jasmonate induction of anti-herbivore defense in *Physalis angulata*: seasonal and ontogenetic gradients. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, n. 2, p. 117–126, 2004.

DÓRIA, G. A. A.; SILVA, W. J.; CARVALHO, G. A.; ALVES, R. B.; CAVALCANTI, S. C. H. A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 6, p. 615-620, 2010.

DUTTA, S. Biopesticides: an ecofriendly approach for pest control. **World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 6, p. 250-265, 2015.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

ELGER, A. D.; LEMOINE, D. G.; FENNER, M.; HANLEY, M. E. Plant ontogeny and chemical defence: older seedlings are better defended. **Oikos**, v. 118, n. 5, p. 767-773, 2009.

FANG, X.; YANG, C. M. A. Q.; YANG, L.; CHEN, X. Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. **Plant Diversity and Resources**, v. 33, n. 1, p. 53-64, 2011.

FAZOLIN, M; COSTA, C. R; DAMACENO, O. J. E. O; ALBUQUERQUE, E. S; CAVALCANTE, A. S. S; ESTRELA, J. L. V. Fumigação de milho para o controle do gorgulho utilizando caule de *Tanaecium nocturnum*(Bignoniaceae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 1, p 1-6, 2010.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. J. C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Croton**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17497>>. Acesso em: 16 de Novembro de 2016.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; BRILHANTE, R. S.N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 5, p. 1383-1390, 2008.

FORNARI, T.; VICENTE, G.; VÁZQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M. R.; REGLERO, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, p. 34-48, 2012.

GILLIJ, Y. G.; GLEISER, R. M.; ZYGADLO, J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2507-2515, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOODGER, J. Q.; GLEADOW, R. M.; WOODROW, I. E. Growth cost and ontogenetic expression patterns of defence in cyanogenic *Eucalyptus* spp. **Trees**, v. 20, n. 6, p.757–765, 2006.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; ZACARONI, L. M.; LIMA, R. K.; PIMENTEL, F. A.; MORAIS, A. R. Influence of light and temperature on the oxidation of the essential oil of lemongrass (*Cymbopogon Citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

JAKIEMIU, E. A. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. Dissertação de Mestrado. Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná, 2008, 90 p.

LAZZARI, S. M. N.; KARKLE, A. F.; LAZZARI, F. A. Resfriamento artificial para o controle de Coleoptera em arroz armazenado em silo metálico. **Revista Brasileira de entomologia**, v. 50, n. 2, p. 293-296, 2006.

LEAL, I. R.; SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; JUNIOR LACHER, T. E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 139-146, 2005.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p.161-165, 2009.

LIMA, G. P. G.; SOUZA, T. M.; FREIRE, G. P.; FARIAS, D. F.; CUNHA, A. P.; RICARDO, N. M. P. S.; MORAIS, S. M. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **Parasitol Res**, v. 112, n. 5, p. 1953-1958, 2013.

LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica**, v. 8, n. 2, p. 177-231, 2008.

LIN, J.; DOU, J.; XU, J.; AISA, H. A. Chemical Composition, Antimicrobial and Antitumor Activities of the Essential Oils and Crude Extracts of *Euphorbia macrorrhiza*. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5030-5039, 2012.

LIRA, C. S.; PONTUAL, E. V.; ALBUQUERQUE, L. P.; PAIVA, L. M. P.; PAIVA, P. M. G.; OLIVEIRA, J. V.; NAPOLEÃO, T. H.; NAVARRO, D. M. A. F. Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil). **Crop Protection**, v. 71, p. 95-100, 2015.

LIU, Z. L.; CHU, S. S.; LIU, Q. R. Chemical Composition and Insecticidal Activity against *Sitophilus zeamais* of the Essential Oils of *Artemisia capillaris* and *Artemisia mongolica*. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2600-2608, 2010.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Epidemiologia e controle das bactérias das hortaliças. In: ZAMBOLIM, L.; LOPES, C. A.; PIKANÇO, M. C.; COSTA, H. **Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: Editora Universitária, 2007. pp. 115-162.

LÓPEZ, S. B.; LÓPEZ, M. L.; ARAGÓN, L. M.; TERESCHUK, M. L.; SLANIS, A. C.; FERESIN, G. E.; ZYGADLO, J. A.; TAPIA, A.A. Composition and Anti-insect Activity of Essential Oils from *Tagetes* L. Species (Asteraceae, Helenieae) on *Ceratitis capitata* Wiedemann and *Triatoma infestans* Klug. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5286-5292, 2011.

LORINI, I. **Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados**. 2 ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2003. 80 p.

MAGALHÃES, C. R. I.; OLIVEIRA, C. R. F.; MATOS, C. H. C.; BRITO, S. S. S.; MAGALHÃES, T. A.; FERRAZ, M. S. S. Potencial inseticida de óleos essenciais sobre *Tribolium castaneum* em milho armazenado **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1150-1158, 2015.

MAIA, G.N. **Caatinga: árvores, arbustos e suas utilidades**, 1ª ed. São Paulo: editora D&Z Computação Gráfica e Editora, 2004, 413p.

MARSARO JUNIOR, A. L.; LAZZARI, S. M. N.; FIGUEIRA, E. L. Z.; HIROOKA, E. Y. Amylase inhibitors in corn hybrids as a resistance factor to *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, p. 433-450, v.34, n. 3, 2005.

MELO, J. I. M. Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil: Boraginaceae *sensu lato*. **Biotemas**, v. 25, n. 4, p. 109-120, 2012.

MELO, L. A.; TEBALDI, N. D.; MEHTA, A.; MARQUES, A. S. A. Comparing *Acidovorax citrulli* strains from melon and watermelon: Phenotypic characteristics, pathogenicity and genetic diversity. **Tropical plant pathology**, v. 39, n. 2, p. 154-162, 2014.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2001, p. 150.

MIRANDA, C. A. S. F. **Atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas de diversas plantas**. Dissertação de Mestrado. Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras, 2010, 151 p.

MOTA, M. L.; LOBO, L. T. C.; COSTA, J. G. M.; COSTA, L. S.; ROCHA, H. A. O.; SILVA, L. F. R.; POHLIT, A. M.; NETO, V. F. A. *In Vitro* and *In Vivo* Antimalarial Activity of Essential Oils and Chemical Components from Three Medicinal Plants Found in Northeastern Brazil. **Planta medica**, v. 78, n. 7, p. 658-644, 2012.

MWINE, J. T.; DAMME, P. V. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 652-662, 2011.

NAGHILOO, S.; MOVAFEGHI, A.; DELAZAR, A.; NAZEMIYEH, H.; ASNAASHARI, S.; DADPOUR, M. R. Ontogenetic variation of total phenolics and antioxidant activity in roots: leaves and flowers of *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae). **BioImpacts**, v.2, n. 2, p. 105-109, 2012.

NAPOLEÃO, T. H.; AGRA-NETO, AFONSO, C.; BELMONTE, B. R.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G. 2015. Biology, ecology and strategies for control of stored-grain beetles: a review. In: STACK, C. **Beetles: Biodiversity, Ecology and Role in the Environment (Insects**

**and Other Terrestrial Arthropods: Biology, Chemistry and Behavior**). Estados Unidos, Nova York: Nova Science Publishers Inc, 2015. pp. 105-121.

NASCIMENTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, E. I. Alternative hosts of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 345-349, 2004.

NICULAU, E. S.; ALVES, P. B.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.; MATOS, A. P.; BERNARDO, A. R.; VOLANTE, A. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G.; CORRÊA, A. G.; BLANK, A. F.; SILVA, A. C.; RIBEIRO, L. P. Insecticidal activity of essential oils of *Pelargonium graveolens* Herit and *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Química Nova**, v.36, n. 9, p. 1391, 1394, 2013.

NOGUEIRA, L. M.; SILVA, M. R.; SANTOS, S. M.; ALBURQUERQUE, J. F. C.; FERRAZ, I. C.; ALBUQUERQUE, T. T.; MOTTA, C. R. F. C.; ARAÚJO, R. M.; VIANA, G. S. B.; MARTINS, R. D.; HAVT, A.; XIMENES, R. M. Antinociceptive effect of the essential oil obtained from the leaves of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae) in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-7, 2015.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 308-312, 2010.

PAES, J. L.; FARONI, L. R. D. A.; DHINGRA, O. D.; CECON, P. R.; SILVA, T. A. Insecticidal fumigant action of mustard essential oil against *Sitophilus zeamais* in maize grains. **Crop Protection**, v. 34, p. 56-58, 2012

PEIXOTO, R. N. S.; GUILHON, G. M. S. P.; ZOGHBI, M. G. B.; ARAÚJO, I. S.; UETANABARO, A. P. T.; SANTOS, L. S.; BRASIL, D. S. B. Volatiles, A Glutarimide Alkaloid and Antimicrobial Effects of *Croton pullei* (Euphorbiaceae). **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3195-3205, 2013.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba, São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ Universidade de São Paulo, 2004, 26 p.

PICHERSKY, E.; GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 10, p. 439-445, 2000.

PICHERSKY, E.; NOEL, J.P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 808-811, 2006.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1163, n. 1-2, p. 2-24, 2007.

PRADO, D. 2003. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife: Editora Universitária, 2003. pp. 3-73.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. Dissertação de Mestrado. Botucatu, SP: Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho, 2012, 112 p.

RAMOS, J. M. O.; SANTOIA, C. A.; SANTANA, D. G.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; THOMAZZI, S. M. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 4, p. 644-650, 2013.

RODRIGUES, I. A.; AZEVEDO, M. M. B.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R.; CORTE-REAL, S.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; ROSA, M. S. S. VERMELHO, A. B. In vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Croton cajucara* (red sacaca) and its major constituent 7-hydroxycalamenene against *Leishmania chagasi*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 449, p. 1-9, 2013.

ROSA, M. S. S. R.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A. S.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 6 June 2003, p. 1895–1901, 2003.

ROSSI, D.; GUERRINI, A.; MAIETTI, S.; BRUNI, R.; PAGANETTO, G.; POLI, F.; SCALVENZI, L.; RADICE, M.; SARO, K.; SACCHETTI, G. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 837-848, 2011.

SALATINO, A.; SALATINO, F. S.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K. A.; LIRA, C. S.; LIMA, B. N.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; MARANHÃO, C. A.; BRANDÃO, S. S. F.; NAVARRO, D. M. A. F. Effects of *Croton rhamnifolioides* Essential Oil on *Aedes aegypti* Oviposition, Larval Toxicity and Trypsin Activity. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16573-16587, 2014.

SECCO, R. S.; CORDEIRO, I.; SENNA-VALE, L.; SALES, M. F.; LIMA, L. R.; MEDEIROS, D.; HAIAD, B. S.; OLIVEIRA, A. S.; CARUZO, M. B. R.; CANEIRO-TORRES, D.; BIGIO, N. C. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae s.l. in Brazil. **Rodriguésia**, n. 63, v. 1, p. 227-242, 2012.

SILVA, A. C. O.; ALBUQUERQUE, U. P. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 17-26, 2005.

SILVA, C. V.; ZAGO, H. B.; CAMARA, C. A. G.; OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; SCHWARTZ, M. O. E.; LUCENA, M. F. A. Composition and Insecticidal Activity of the



Essential Oil of *Croton grewoides* Baill. against Mexican Bean Weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boheman). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 179-182, 2008.

SILVA, J. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v.24, n. 2, p. 441-153, 2010.

SIMIONATTO, E.; BONANI, V. F. L.; MOREL, A. F.; POPPI, N. R.; RAPOSO JÚNIOR, J. L.; STUKER, C. Z.; PERES, M. T. L. P.; HESS, S. C. Chemical Composition and Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities of the Essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) Stem Bark. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 879-885, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010. 1104 p.

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAUB, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 99-102, 2006.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M.C; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife: Editora Universitária, 2003. pp 777- 796.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 954 p.

TORRES, C.; SILVA, G.; TAPIA, M.; RODRÍGUEZ, J. C.; FIGUEROA, I.; LAGUNES, A.; SANTILLÁN, C.; ROBLES, A.; AGUILAR, S.; TUCUCH, I. Insecticidal activity of *Laurelia*

*sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 74, n. 4, p. 421-426, 2014.

TORRES, M. C. M.; ASSUNÇÃO, J. C.; SANTIAGO, G. M.; ANDRADE-NETO, M.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. C.; BEZERRA, D. P.; FILHO, J. D. B. M.; VIANAC, F. A.; PESSOA, O. D. L. Larvicidal and Nematicidal Activities of the Leaf Essential Oil of *Croton regelianus*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, p. 2724-2728, 2008.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of Essential Oils: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40-53, 2013.

VALGIMIGLI, L. **Essential oils as natural food additives: composition, applications, antioxidant and antimicrobial properties** 1. ed. New York: Nova Science Publishers, 2012, 466 p.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A.; BERGAMIN, A. C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, p. 105-113, 2015.

VINHA, M. B; PINTO, C. L. O; PINTO, C. M. F; SOUZA, C. F; SOUZA, M. R. M; OLIVEIRA, L. L. Impactos do uso indiscriminado de agrotóxicos em frutas e hortaliças. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 3, n. 1, p.1-5, 2011.

VUNDA, S. L. L.; SAUTER, I. P; CIBULSKI, S. P.; ROEHE, P. M.; BORDIGNOM. S. A. L.; ROTT, M. B.; APEL, M. A.; VON POSER, G. L. Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. **Journal of Parasitology Research**, v. 111, p. 961-966, 2012.

WAKEFIELD, M. E; BRYNING, G. P; CHAMBERS, J. Progress towards a lure to attract three stored product weevils, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Sitophilus oryzae* (L.) and *Sitophilus granarius*(L.) (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 41, n. 2, p. 145-161, 2005.

WANG, D. C., QIU, D. R.; SHIA, L. N.; PAN, H. Y.; LI, Y. W.; SUN, J. Z.; XUE, Y. J.; WEI, D. S.; LI, X.; ZHANG, Y. M.; QIN, J. C. Identification of insecticidal constituents of the essential oils of *Dahlia pinnata* Cav. against *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus oryzae*. **Natural Product Research**, v. 29, n. 18, p. 1748-1751, 2015.

WOJAKOWSKA, A.; MUTH, D.; NAROZNA, D.; MADRZAK, C.; STOBIECKI, M.; KACHLICKI, P. Changes of phenolic secondary metabolite profile in the reaction of narrow leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) plants to infections with *Colletotrichum lupine* fungus or treatment with its toxin. **Metabolomics**, v. 9, n. 3, p. 575-589, 2013.

XIMENES, R. M.; NOGUEIRA, L. M.; CASSUNDÉ, N. M. R.; JORGE, R. J. B.; SANTOS, S. M.; MAGALHÃES, L. P. M.; SENA, K. X. F. R.; ALBUQUERQUE, J. F. C.; MARTINS, R.D. Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. essential oil. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 4, p. 758-764, 2013.

# **CAPÍTULO 1**

## **4. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO CROP PROTECTION**

**Chemical characterization, insectidal effect against *Sitophilus zeamais* and anti-phytopathogenic activity of essential oil from *Croton rudolphianus* leaves**

Ingridd Ayslane Torres de Araújo Ribeiro<sup>1</sup>, Rosimere da Silva<sup>1</sup>, Alexandre Gomes da Silva<sup>1,2</sup>, Paulo Milet-Pinheiro<sup>3</sup>, Patrícia Maria Guedes Paiva<sup>1</sup>, Thiago Henrique Napoleão<sup>1</sup>, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro<sup>3</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>1,2</sup> and Maria Tereza dos Santos Correia<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica-CB, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>2</sup> Núcleo de Bioprospecção e Conservação da Caatinga - Instituto Nacional do Semiárido/ Ministério da Ciência Tecnologia, inovações e comunicações, 58434-700, Campina Grande, Paraíba, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Química Fundamental-CCEN, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

Corresponding author: E-mail address: thiago86@yahoo.com.br (T.H. Napoleão), Av. Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Pernambuco, Brazil. Tel.: +55(81)21268540.

**Abstract**

The maize weevil *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) is a cosmopolitan pest that infects healthy grains in the field and during postharvest storage. Some bacteria - as *Acidovorax citrulli*, *Pectobacterium carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* - cause damage in the agriculture and need to be controlled to maintain the quality and abundance of food, feed, and fiber produce. The control of *S. zeamais* and phytopathogenic bacteria in agriculture depends mostly on the application of pesticides. However, the use of synthetic pesticides causes several problems, including environmental pollution, side effects in human health and the development of resistant insect populations. This study reports the chemical composition of the essential oil (EO) from *Croton rudolphianus* leaves, as well as its insecticidal and repellent effects on *S. zeamais*, and antimicrobial activity against phytopathogenic bacteria. The analysis of the EO composition was performed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) and revealed 77 compounds, mainly sesquiterpenes. The major

constituents of the oil were methyl chavicol (20.55%), (*E*)-caryophyllene (11.21%), bicyclogermacrene (10.23%) germacrene D (7.51%) and limonene (7.01%). The *C. rudolphianus* oil was toxic to *S. zeamais* by ingestion (LC<sub>50</sub> 107.26 µL/g), contact (LC<sub>50</sub> 70.64 µL/mL) and fumigation (best mortality rate of 43.75% at 64 µL/L). Furthermore, in the repellency assay the EO attracted adult insects. This EO also showed an antiphytopatogenic effect on five bacteria tested with best MIC and MBC values of 1.56 and 25 µL/mL against *Ralstonia solanacearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, respectively. The results showed that *C. rudolphianus* oil was toxic to *S. zeamais* adults and phytopatogenic bacteria, consequently it is a source of insecticide and anti-phytopathogenic compounds.

**Keywords:** Antimicrobial, Botanical insecticide, *Croton*, Essential oil, Maize weevil.

## 1. Introduction

The maize weevil *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae), is the major pest of maize, attacking also sorghum, rice, wheat, and processed food products like pasta and biscuits (Fazolin *et al.*, 2010). This cosmopolitan insect infects healthy grains in the field and during postharvest storage (Abebe *et al.*, 2009). According to Tefera *et al.* (2011) and Yuya *et al.* (2009), *S. zeamais* and others storage insect pests (*Sitophilus oryzae*, *Prostephanus truncatus* and *Sitotroga cerealella*) cause about 20-30% of maize loss, affecting food security, nutritional value and low market value.

Besides insects, phytopathogenic bacteria cause a considerable damage in economically exploited cultures worldwide, impacting nutritional value food of and food safety (Vidaver; Lambrecht, 2004). *Acidovorax citrulli* - causing bacterial fruit blotch in cucurbits - (Melo *et al.*, 2014); *Pectobacterium carotovorum* - causal agent of bacterial soft rot - (Carvalho Filho; Mello, 2008); *Ralstonia solanacearum* - causing bacterial wilt in a very wide range of potential host plants - (Lopes; Quezado-Duval, 2007); and *Xanthomonas campestris* - causes a variety of plant diseases as black root crucifers and bacterial canker - (Michereff, 2001) are examples of bacteria that cause important plants diseases in Brazil.

The control of maize weevil and phytopathogenic microorganisms in agriculture depends mostly on the application of pesticides. However, the use of synthetic pesticides has led to several

problems, including environmental pollution, side effects in human health and the development of resistant insect populations (Bravo *et al.*, 2011). This fact has highlighted the need for the use of biopesticides that are commonly environmentally friendly and safe to humans (Dutta, 2015; Ebadollahi, 2011).

Essential oils (EO's) are volatile, natural, complex mixtures characterized by a strong odour, formed by aromatic plants as secondary metabolites, and also play an important role in the protection of the plants (Bakkali *et al.*, 2008). Due to this, some of them have been studied due to their insecticide and antimicrobial potential (Lira *et al.*, 2015; Magalhães *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2012).

The genus *Croton* (Euphorbiaceae) comprises about 1300 species of trees, shrubs and herbs that are widely distributed in tropical regions (Lima; Pirani, 2008). Some EO's from *Croton* species showed insecticide and antimicrobial effects (Magalhães *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2013; Azevedo *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2013). *C. rudolphianus*, commonly known as “velame-branco”, is an endemic species in Brazil that ranges from the Northeast to the Southeast (Silva *et al.*, 2010) which has still not been studied.

In this paper, we aimed to determine the chemical composition of the EO from *C. rudolphianus* leaves, to evaluate the insecticidal effect of the EO on *S. zeamais* by contact, fumigation, and ingestion assays, and to assess the antimicrobial activity of this EO against phytopathogenic bacteria for the first time.

## **2. Materials and Methods**

### ***2.1 Plant Material***

Leaves of *C. rudolphianus* were collected from rock formations in the Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco State, Brazil, in March 2015. The plant material was identified by Dr. Alexandre Gomes da Silva (Instituto Nacional do Semiárido, Campina Grande, PB, Brazil) and a voucher specimen has been deposited at the Herbarium of the Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA, Recife, PE, Brazil), with voucher number IPA 91.091. The plant collections in the Parque Nacional do Catimbau were authorized by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio (Sisbio 26743-3).

## ***2.2 Extraction of essential oils***

Samples of fresh leaves were triturated and submitted to hydrodistillation technique, in a Clevenger-type apparatus for 6 h, after that EO layer was separated, dried over anhydrous sodium sulfate and transferred to amber-glass vials, resulting in essential oil *C. rudolphianus* leaves. This procedure was repeated three times using different collections and the yield of EO was determined as the quotient of the weight of oil collected and the weight of plant material extracted, and expressed in %  $\pm$  S.D. (w/w). The EO's were stored in amber-glass at 4°C until chemical analysis and biological assays.

## ***2.3 Chemical characterization of the essential oil***

Oil samples were analyzed on a Gas Chromatograph (model 7890A; Agilent Technologies; Palo Alto, CA, USA) equipped with an Agilent J & W non-polar HP-5ms<sup>TM</sup> column (30 m x 0.25 mm id.; 0.25  $\mu$ m film thickness) and coupled to a mass selective detector (model 5975C; Agilent Technologies; Palo Alto, CA, USA). The analytical conditions were: oven temperature held at 40°C for 2 min then increased to 230 °C at 4 °C/min and subsequently held at 230 °C for 5 min; helium flow maintained constant at 100 kPa; MS source set at 230 °C; quadrupole temperature set at 150 °C; mass spectra recorded at 70 eV in EI mode and scanned in the range  $m/z$  35-350 at a speed of 0.5 s/scan. For each essential oil sample, a 1  $\mu$ L aliquot of a solution of oil dissolved in hexane (10  $\mu$ l of oil in 990  $\mu$ l of hexane) was injected in split mode (1:300).

Individual components of the essential oil were identified by comparison of Retention Indices (RI), obtained by co-injection of sample with C9–C30 linear hydrocarbons and calculated according to the Van den Dool and Kratz equation (Van Den Dool; Kratz, 1963) with those reported in the literature. The MS data acquired for each component were matched with those stored in the mass spectral library of the GC-MS system (MassFinder 4, NIST08 and Wiley Registry<sup>TM</sup> 9<sup>th</sup> Edition) and with published spectra (Adams, 2009) in order to confirm identity.



## 2.4 Insecticidal assay

### 2.4.1 Insects

*S. zeamais* adults were reared at the Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. The colonies were maintained in glass containers (1 L capacity) covered with unwoven fabric at  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , 70% relative humidity, 12:12 L:D photoperiod. The *S. zeamais* diet consisted of selected maize grains. Insects 30-60 days old were used in the assays. The insect rearing was authorized by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) of the Brazilian Ministry of the Environment (permit number 36301).

### 2.4.2 Evaluation of the toxicity of the essential oil by ingestion

Toxicity by ingestion of the EO of *C. rudolphianus* leaves was performed according to Napoleão *et al.* (2013). An artificial diet was prepared by a suspension of autoclaved wheat flour (2.0 g) in 5 mL of oil solution (in 1% tween 80) to achieve the final concentrations of 31.25, 62.5 and 125  $\mu\text{L/g}$  ( $\mu\text{L}$  of neat oil/g of wheat flour). Subsequently, five aliquots of 200  $\mu\text{L}$  of the suspension were placed in Petri dishes (90 x 100 mm, with known weight) using a micropipette fitted with a disposable tip cut at the narrow end to produce an internal diameter of 2 mm and left in heating chamber at  $30^\circ\text{C}$  for 48 h to dry. Next, each Petri dish was weighed again and the mass of the flour disks was calculated. Then, twelve *S. zeamais* adults (with known weight) were transferred to each Petri dish. Each assay in this experiment had five replicates. The control diet was composed by wheat flour (2 g) and a solution of distilled water and 1% tween 80 (5 mL). The assays were maintained at  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  in darkness for 7 days. After this period, the mortality rate and the weights of broken flour disks and insects were registered.

The feeding-deterrence index was calculated (Isman *et al.*, 1990), as  $\text{FDI} (\%) = 100 \times (C-T)/C$ , where  $C$  is the consumption of control disks, and  $T$  the consumption of treated disks. On the basis of FDI, samples were classified according to Liu *et al.*, (2007): no feeding deterrence ( $\text{FDI} < 20\%$ ); weak feeding deterrence ( $50\% > \text{FDI} \geq 20\%$ ); moderate feeding deterrence ( $70\% > \text{FDI} \geq 50\%$ ); or strong feeding deterrence ( $\text{FDI} \geq 70\%$ ).

The nutritional parameters were calculated according to Xie *et al.* (1996): (i) Relative consumption rate (RCR) = (mg of biomass ingested)/(mg of initial insect biomass × days); (ii) Relative biomass gain (RBG) = (mg of biomass gained)/(mg of initial insect biomass × day); and (iii) Efficiency of conversion of food (ECI) (%) =  $100 \times (\text{biomass gained})/(\text{food ingested})$ .

#### 2.4.3 Evaluation of the contact toxicity of the essential oil

The contact toxicity assay was performed according to Liu and Ho (1999). A serial dilution of the EO of *C. rudolphianus* was prepared in 1% tween 80 to achieve test solutions at 0.75, 1.88, 7.5, 37.5, 75  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Then, aliquots of 0.5  $\mu\text{L}$  (per insect) from the test solutions were topically applied dorsally to the thorax of *S. zeamais* adults using a micropipette. The insects of the negative control were treated with 1% tween 80. Twenty insects were used for each concentration and control, and the experiment was replicated five times. Subsequently, both treated and control insects were transferred to plastics containers (4.0 cm width and 6.0 cm length) (20 insects/container). The containers were maintained at  $28 \pm 2$  °C in darkness for 7 days. After this period, the mortality rate was recorded.

#### 2.4.4 Evaluation of the fumigant toxicity of the essential oil

To fumigant toxicity was performed according an adaptation of the method described by Chu *et al.* (2010). In that assay it was used plastic containers (4.0 cm width, 6.0 cm length and 80 mL volume) whose lids were covered with filter paper. The filter paper had previously been soaked with neat EO of *C. rudolphinaus* to provide final concentrations of 16, 32 and 64  $\mu\text{L}/\text{L}$  in air. Then, after 30 seconds, twelve *S. zeamais* adults were placed in each plastic container and the lids were tightly closed in order to form a sealed chamber. After 24 h, the insects were transferred to clean and ambient containers. Five replicates were used in all treatments and they were incubated at  $28 \pm 2$  °C in darkness for 7 days. After this period, the mortality rate was recorded.

#### 2.4.5 Evaluation of the repellent effect of the essential oils

To establish the repellent effect of EO against *S. zeamais*, it was used arenas similarly to that described by Lira *et al.* (2015). The arena was formed by three plastic containers (4.0 cm width and 6.0 cm length), where the central container was connected symmetrically with the two others containers through silicone tubes (11.5 mm and 7.0 cm of length). A piece of filter paper soaked with 20  $\mu$ L of a solution with EO was placed in one container and another piece soaked with 20  $\mu$ L of a solution with 1% tween 80 (control) was placed in the other one. Furthermore, ten *S. zeamais* adults were released in the central container. The arenas were incubated at  $28 \pm 2$  °C in darkness for 7 days. After this period, the number of insects present in each container was recorded. Then, the repellence index (RI) was calculated (Mazzonetto; Vendramim, 2003), as  $(RI) = 2T/(T + C)$ , where *T* is the percentage of insects in the treatment (oil container) and *C* is the percentage of insects in the control container. Standard deviations (SD) were calculated and the results were classified as:  $RI \pm S.D. > 1$ , attractive effect; and  $RI \pm S.D. < 1$ , repellent effect. Different oil concentrations (18.5, 37.5, 75  $\mu$ L/mL) were tested separately and each assay had four replicates.

### 2.5 Antibacterial activity

#### 2.5.1 Microorganisms

All phytopathogenic bacteria used in the antimicrobial assays were provided by the culture collection of Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil. The six bacteria (*Acidovorax citrulli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) were maintained on NYD medium (meat extract 3 g, yeast powder extract 5 g, peptone 5 g, dextrose 10 g, agar 15 g, 1000 mL distilled water).

### 2.5.2 Determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

The *in vitro* antibacterial activity of the EO from *C. rudolphianus* leaves was evaluated by determining the MIC (the lowest concentration of the samples capable to inhibit the growth of microorganism) based on a microdilution method in a 96 multi-well microplates (CLSI, 2015). The EO was diluted in 1% of tween 80, obtaining a final concentration of 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . To standardize the bacteria inoculum, all phytopathogenic bacteria were cultured overnight at 30 °C on NYD medium, afterwards the suspension of these microorganisms was performed using a 0.09% saline solution and adjusted to the 0.5 in standard McFarland scale (equivalent to  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL). Microdilutions of the EO were prepared in 96 multi-well microplates to obtain final concentrations ranging from 100 to 0.390  $\mu\text{L}/\text{mL}$  and each well of the microplate received 100  $\mu\text{L}$  of NYD broth medium and 10  $\mu\text{L}$  of the microbial suspension (except in the wells of medium sterility control). The microplates were incubated at 30 °C for 24 h.

To evaluate the MIC's results it was used resazurin (Sigma-Aldrich), which is a colorimetric marker of metabolic activity and proliferation of living cells. Thus, the change in the coloration of resazurin (blue to rose) indicates microbial growth. To determine the MBC, 10  $\mu\text{L}$  of the wells with oil concentrations at which no bacterial was observed growth were inoculated on Petri dishes containing NYD medium. Those dishes were incubated at 30 °C for 24 h. The MBC was considered the lowest concentration that did not allow the reactivation of the microorganisms in the medium without the antimicrobial agent (Sahin *et al.*, 2004). The MIC's and MBC's were expressed in  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Each assay in this experiment had three replicates.

### 2.6 Statistical analysis

The data were expressed as a mean of replicates  $\pm$  Standard Desviation (S.D.), which were calculated using Microsoft Office Excel version 14.0 for Windows. Oneway fixed-effects ANOVA (significance at  $p < 0.05$ ) was conducted using the Minitab 17 Statistical Software. Furthermore, significant differences between treatment groups from all assays were analyzed using Tukey's test (significance at  $p < 0.05$ ) by the Minitab 17 Statistical Software. The lethal concentration required to kill 50% of insects ( $\text{LC}_{50}$ ) was calculated by probit analysis with a

reliability interval of 95% in the program StatPlus version 5.98 for Windows using the mortality rates calculated by Abbott's correction.

### 3. Results

#### 3.1 Extraction and chemical characterization of the oil

The yield of the essential oil obtained by hydrodistillation from *C. rudolphianus* leaves was  $1.13 \pm 0.25\%$  (w/w). The analyses by GC-MS of *C. rudolphianus* EO revealed 77 compounds (**Table 01**). The sum of identified components represented more than 92% of the total of components found in the essential oil. Sesquiterpenes corresponded to the dominant compound class with about 47.38% of all oil components, followed by phenylpropanoid (25.4%) and monoterpenes (18.49%). The major constituent of the oil was the phenylpropanoid methyl chavicol (20.55%), followed by the sesquiterpenes (*E*)-caryophyllene (11.21%), bicyclogermacrene (10.23%) and germacrene D (7.51%), and the monoterpene limonene (7.01%).

#### 3.2 Evaluation of toxicity by ingestion

EO of *C. rudolphianus* induced mortality on *S. zeamais* adults in a dose-dependent manner (**Fig. 01**). Statistical analysis revealed there was significant difference between the means (F-statistics: 305.79;  $p < 0.001$ ; numerator and denominator degrees of freedom: 3 and 14, respectively), and the  $LC_{50}$  was 107.26 (95% confidence interval: 96.94 - 117.58)  $\mu\text{L/g}$

Furthermore, it was observed that the presence of *C. rudolphianus* oil in the diet interfered in insects nutrition. Relative consumption rate (**Fig. 02A**) showed that the insects ingested more food in the diet with EO at 62.5 and 125  $\mu\text{L/g}$  (in a dose-dependent manner) than in the control and diet with 31.25  $\mu\text{L/g}$  of oil, these results were significantly different (F-statistics: 246.33;  $p < 0.001$ ; numerator and denominator degrees of freedom: 3 and 10, respectively). On the other hand, the relative biomass gain rate (**Fig. 02B**) was significantly equal for the control, 31.35 and 62.5  $\mu\text{L/g}$  treatments and lower at the concentration 125  $\mu\text{L/g}$  (F-statistics: 40.73;  $p < 0.001$ ; numerator and denominator degrees of freedom: 3 and 10, respectively). In addition, the

efficiency in conversion of ingested food (**Fig. 02C**) was lower in treatments with oil at 62.5 and 125  $\mu\text{L/g}$  (in a dose-dependent manner) (F-statistics: 55.95;  $p < 0.001$ ; numerator and denominator degrees of freedom: 3 and 10, respectively), revealing that *S. zeamais* had difficulty to digest the food containing the oil. In relation to feeding-deterrence indexes, no deterrence was observed in any concentration of the EO used in treatments.

### ***3.3 Evaluation of toxicity by contact***

The EO of *C. rudolphianus* has led to increasing *S. zeamais* mortality rates in a dose-dependent manner (**Fig. 03**) when applied topically on the insects. Statistical analysis revealed that there was significant difference between the means (F-statistics: 61.20;  $p < 0.001$ ; numerator and denominator degrees of freedom: 5 and 24, respectively). The  $\text{LC}_{50}$  determined was 70.64 (95% confidence interval: 62.96 - 78.31)  $\mu\text{L/mL}$ .

### ***3.4 Evaluation of fumigant toxicity***

The essential oil from *C. rudolphianus* demonstrated fumigant toxicity on *S. zeamais* adults in a dose-dependent manner (**Fig. 04**). In 64  $\mu\text{L/mL}$  treatment was observed the best mortality rate ( $43.75 \pm 4.79$  %). According the statistical analysis, there was significant difference between the means (F-statistics: 9.00;  $p = 0.007$ ; numerator and denominator degrees of freedom: 2 and 9, respectively).

### ***3.5 Evaluation of repellent effect***

The essential oil from *C. rudolphianus* showed attractive effect on insects at all tested concentrations (**Fig. 05**). The statistical analysis indicated that there was no significant difference between the means (F-statistics: 0.85;  $p = 0.464$ ; numerator and denominator degrees of freedom: 2 and 8, respectively).

### 3.6 Antimicrobial activity

Antimicrobial activity was determined by the susceptibility test (microdilution method) against six phytopathogenic bacteria. The results showed that EO of *C. rudolphianus* was active against five bacteria (**Table 02**) and the best MIC and MBC values observed were 1.56  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (against *Ralstonia solanacearum*) and 25  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (against *Pectobacterium carotovorum* subsp.).

## 4. Discussion

The yield of the EO of *C. rudolphianus* ( $1.13 \pm 0.35$  %) can be compared to those of oils extracted from other *Croton* species found in Brazil, as *C. heliotropiipholius* (*C. rhamnifolioides*) and *C. regelianus*, both 0.80% (Santos *et al.*, 2014; Bezerra *et al.*, 2009), *C. cajucara* red variation 0.97% (Chaves *et al.*, 2006) and *C. cordiifolius* (0.81%) (Nogueira *et al.*, 2015).

In general, some EO's from *Croton* species contain the same major constituents from *C. rudolphianus* - methyl chavicol, (*E*)-caryophyllene, bicyclogermacrene, germacrene D and limonene - for instance, *C. grewioides* (*C. zehntneri*) has methyl chavicol (93.6%) (Donati *et al.*, 2015); *C. isabellei*, *C. argyrophyllus*, *C. heliotropiipholius* (*C. rhamnifolioides* and *C. conduplicatus*) and *C. adamantinus* have (*E*)-caryophyllene (14.3, 9.75, 6.79, 6.33 and 5.8%, respectively) (Vunda *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2014; Ximenes *et al.*, 2013); *C. isabelli*, *C. heliotropiifolius* (*C. conduplicatus*), *C. campestris* and *C. argyrophyllus* have bicyclogermacrene (48.90, 19.98, 16.20, 14.60 and 13.76%, respectively) (Vunda *et al.*, 2012; Dória *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2014); *C. isabelli*, *C. heliotropiipholius* (*C. rhamnifolioides*), *C. pulegioides*, *C. pallidulus* have germacrene D (12.6, 11.85, 10.55 and 7.6%, respectively) (Dória *et al.*, 2010; Vunda *et al.*, 2012); and *C. campestris* and *C. lechleri* have limonene (9.7 and 4.2%, respectively) (Almeida *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2011).

The oil from *C. rudolphianus* leaves induced mortality of *S. zeamais* when ingested. However, this oil did not show any feeding deterrent effect at all concentrations tested. Furthermore, the insects feed more in the artificial diet with the EO at 62.5 and 125  $\mu\text{L}/\text{g}$  (in a dose-dependent manner) than the control and diet at 31.35  $\mu\text{L}/\text{g}$  of oil. On the other hand they showed reduced efficiency in conversion of ingested food than the insects from control and 31.25

$\mu\text{L/g}$  of oil. Because of this fact, the anti-nutritional effects and mortality observed were probably linked to post-ingestion effects, such as intoxication, and not pre-ingestion effects (Lira *et al.*, 2015, Stefanazzi *et al.*, 2011). Besides that, according to the results obtained in this study, the EO from *C. rudolphianus* could be potentially useful to control *S. zeamais*, which is one of the major pests in stored grains in Brazil (Napoleão *et al.*, 2015).

The EO of *C. rudolphianus* also showed contact toxicity against *S. zeamais* adults with a  $\text{LC}_{50}$  of  $70.64 \mu\text{L/mL}$ . Previous studies demonstrated that the majoritarian compounds detected in the *C. rudolphianus* oil showed insecticidal effects by contact against *S. zeamais* and other stored grain pests, corroborating the results obtained in this research. For instance, the compounds methyl chavicol and limonene were toxic by contact on *S. zeamais* adults ( $\text{LD}_{50} = 21.54 \text{ mg/adult}$  and  $29.86 \mu\text{g/adult}$ , respectively) (Zhou *et al.*, 2012; Frang *et al.*, 2010). Besides that, these compounds and (*E*)-caryophyllene also showed insecticidal effect, by contact, against *Tribolium castaneum* ( $\text{LD}_{50} = 20.41, 13.40$  and  $41.72 \mu\text{g/adult}$ , respectively) and *Liposcelis bostrychophila* ( $\text{LD}_{50} = 30.22, 239.62$  and  $74.11 \mu\text{g/adult}$ , respectively) (Guo *et al.*, 2015). The contact toxicity of *C. rudolphianus* oil showed in this study might be linked to these compounds.

Many EO's from family Euphorbiaceae and their major constituents have been reported to exert fumigant toxicity effects on *S. zeamais* and other stored grain pest. For example, the EO's from *C. heliotropifolius* and *C. pulegioidorus* were toxic by fumigation against *S. zeamais* and *Tribolium castaneum* (Magalhães *et al.*, 2015; Magalhães, 2014). The oil from *C. pulegioidorus* leaves also caused the death of *Rhyzopertha dominica* adults ( $\text{LC}_{50} = 48.66 \mu\text{L/L}$  in air) (Souza *et al.*, 2016). The oil of *Mallotus apelta* (Euphorbiaceae) showed fumigant toxicity against *S. zeamais* with  $\text{LC}_{50}$  values of  $48.42 \text{ mg/L}$  (Liu *et al.*, 2014). Furthermore, the compounds methyl chavicol and limonene exhibited fumigant toxicity against *S. zeamais* adults with  $\text{LC}_{50}$  values of  $14.10$  and  $33.71 \text{ mg/L}$  in air, respectively (Zhou *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). The (*E*)-caryophyllene was toxic by fumigation on *S. oryzae* ( $\text{LC}_{50} = 1.98 \mu\text{L/cm}^3$ ) (Chaubey, 2012). The methyl chavicol, limonene and (*E*)-caryophyllene represent around 39% of EO of *C. rudolphianus* composition, and then these compounds are probably linked to the fumigant effect detected in our study.

Moreover, the *C. rudolphianus* oil toxicity on *S. zeamais* may be related to inhibition of the acetylcholinesterase (AChE), the main enzyme that terminates nerve impulses by catalyzing the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh). Since methyl chavicol and (*E*)-



caryophyllene, the major constituents of *C. rudolphianus* oil, showed notable inhibition for AChE on *S. oryzae* (López *et al.*, 2015; Chaubey, 2012).

Many essential oils and their constituents were evaluated for repellency against insects (Nerio *et al.*, 2010). In this research, the EO of *C. rudolphianus* exhibited attractive effect on *S. zeamais* adults. However, some oil from *Croton* species had repellent effects against maize weevil, as *C. heliotropifolius* and *C. pulegioidorus* (RI = 0.86 and 0.23, respectively) (Magalhães, 2014). In addition, the methyl chavicol and limonene showed repellent effects on *S. zeamais* with a  $RC_{50}$  of 0.126 and 0.213 mg/cm<sup>2</sup>. These compounds also had repellent effects against *R. dominica* and *Tribolium confusum* (Bedini *et al.*, 2016). The literature survey indicates that the bioactivity properties of essential oils is generally attributed to: a synergistic phenomenon among the major and minor components (You *et al.*, 2014), some particular compounds or majoritarian compounds (Nerio *et al.*, 2010). Then the attractive activity of the oil of *C. rudolphianus* is probably link to these.

According to the antimicrobial results, it is clear that the EO of *C. rudolphianus* has a potential antibacterial effect against five phytopathogenic bacteria tested. Previous studies demonstrated that EO's show a considerable antimicrobial activity due to the presence of chemical compounds such as monoterpenes, sesquiterpenes and phenolic compounds (Gomez *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2013; Fontenelle *et al.*, 2008). The EO from *Origanum vulgare* leaves that has (*E*)-caryophyllene and germacrene D as major compounds, as *C. rudolphianus*, showed antibacterial effect on *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* and *Bacillus* sp. (Vasinaukiene *et al.*, 2006). Furthermore, the essential oil from *Croton cajucara* showed anti-phytopatogenic effect against the fungi *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus* and *Fusarium solani* (Azevedo *et al.*, 2013; Azevedo *et al.*, 2014). Lucas *et al.* (2012) observed that, the EO's from citronella, clove, cinnamon, lemongrass, eucalyptus and thyme at a concentration of 10% showed antibacterial effect *in vitro* against *Xanthomonas vesicatoria* and also reduce the severity of tomato bacterial spot. In addition, *Cymbopogon citrates* oil inhibited the growth of *Pectobacterium carotovorum* and *Colletotrichum gloeosporioides* in a dose-dependent manner (Jeong *et al.*, 2009).

In summary, the *C. rudolphianus* oil was insecticide and active against bacteria. This oil is a potential alternative to control *S. zeamais* adults. Additionally, this oil could be a possible candidate to the management of the diseases caused by different phytopathogenic bacteria. These

effects are probably linked to major compounds of the oil (methyl chavicol, (*E*)-caryophyllene, bicyclogermacrene, germacrene D and limonene), which were previously reported in the literature to act as insecticides and antimicrobial agents. The EO also exhibited attractive effect on *S. zeamais* adults and this could be attributed to synergistic phenomenon, to some particular compounds or to majoritarian compounds.

### **Conflict of interests**

The authors have not declared any conflict of interests.

### **Acknowledgments**

We thank the CNPq, CAPES and FACEPE for financial support and. CNPq and Capes provided PhD and Master fellowships for students involved in this work.

### **References**

- Abebe, F.; Tefera, T.; Mugo, S.; Beyene, Y.; Vidal, S. 2009. Resistance of maize varieties to the maize weevil *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae). **African Journal of Biotechnology**. 8, 5937-5943.
- Adams, R. P. 2009. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Allured Publishing Co. 804 p.
- Almeida, J.; Souza, A. V.; Oliveira, A. P.; Santos, U.; Souza, M.; Bispo, L.; Turatti, Z. C.; Lopes, N. 2014. Chemical Composition of Essential Oils from *Croton conduplicatus* (Euphorbiaceae) in Two Different Seasons, **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. 17, 1137-1145.
- Almeida, T. S.; Rocha, J. B. T.; Rodriguesa, F. F. G.; Campos, A. R. C.; Costa, J. G. M. 2013. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**. 44, 630-633.

Azevedo, M. M. B.; Almeida, C.A.; Chaves, F. C. M.; Campos-Takaki, G. M.; Rozental, S.; Bizzo, H. R.; Alviano, C. S.; Alviano, D. S. 2014. Effects of 7-hydroxycalamenene isolated from *Croton cajucara* essential oil on growth, lipid content and ultrastructural aspects of *Rhizopus oryzae*. **Planta Medica**. 80, 550-556.

Azevedo, M. M. B.; Chaves, F. C. M.; Almeida, C. A.; Bizzo, H. R.; Duarte, R. S.; Campos-Takaki, G. M., Alviano, C. S.; Alviano, D. S. 2013. Antioxidant and Antimicrobial Activities of 7-Hydroxycalamenene-Rich Essential Oils from *Croton cajucara* Benth. **Molecules**. 18, 1128-1137.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**. 46, 446-475.

Bedini, S. B.; Bougherra, H. H.; Flamini, G.; Cosci, F.; Brlhamel, K.; Ascriczzi, R.; Conti, B. 2016. Repellency of anethole- and estragole-type fennel essential oils against stored grain pests: the different twins. **Bulletin of Insectology**. 69, 149-157.

Bezerra, D. P.; Marinho Filho, J. D. B.; Alves, A. P. N. N.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Pessoa, O. D. L.; Torres, M. C. M.; Silveira, E. R.; Viana, F.A.; Casta-Lotufo, L.V. 2009. Antitumor Activity of the Essential Oil from the Leaves of *Croton regelianus* and Its Component Ascaridole. **Chemistry and Biodiversity**. 6, 1224-1231.

Bravo, A.; Likitvivatanavong, S.; GILL, S. S.; Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry Molecular Biology**. 41, 423-431.

Carvalho Filho, R. C.; Mello, S. C. M. 2008. ***Pectobacterium carotovorum*: taxonomia, identificação, sintomatologia, epidemiologia e controle**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. 17p.

Chaubey, M. K. 2012. Acute, Lethal and synergistic effects of some terpenes against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ecologia Balkanica**. 4, 53-62.

Chaves, F. C. M.; Bizzo, H. R.; Angelo, P. C. S.; Xavier, J. J. B. N.; Sá Sobrinho, A. F. 2006. Rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de dois morfotipos de sacaca (*Croton cajucara* Benth.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 8, 117-119.

Chu, S. S.; Liu, Q. R.; Liu, Z. L. 2010. Insecticidal activity and chemical composition of the essential oil of *Artemisia vestita* from China against *Sitophilus zeamais*. **Biochemical Systematics and Ecology**. 38, 489-492.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2015. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard-Tenth Edition.

CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Donati, M.; Mondin, A.; Chen, Z.; Miranda, F.M.; Nascimento, B.B.J.; Schirato, g.; Pastore, P.; Frolidi, G. 2015. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole,  $\beta$ -caryophyllene and myrcene. **Natural Product Research**. 29, 939-946.

Dória, G. A. A.; Silva, W. J.; Carvalho, G. A.; Alves, R. B.; Cavalcanti, S. C. H. 2010. A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical Biology** 48, 615-620.

Dutta, S. 2015. Biopesticides: an ecofriendly approach for pest control. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 4, 250-265.

Ebadollahi, A. 2011. Susceptibility of Two *Sitophilus* species (Coleoptera: Curculionidae) to Essential Oils from *Foeniculum vulgare* and *Satureja hortensis*. **Ecologia Balkanica**. 3, 1-8.

Fang, R.; Jianga, C. H.; Wang, X. Y.; Zhang, H. M.; Liu, Z. L.; Zhou, L.; Du, S. S.; Deng, Z. W. 2010. Insecticidal Activity of Essential Oil of *Carum carvi* Fruits from China and Its Main Components against Two Grain Storage Insects. **Molecules**. 15, 9391-9402.

Fazolin, M.; Costa, C. R.; Damaceno, O.J.E.O.; Albuquerque, E. S; Cavalcante, A.S.S.; Estrela, J.L.V. 2010. Fumigação de milho para o controle do gorgulho utilizando caule de *Tanaecium nocturnum* (Bignoniaceae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 45, 1-6.

Fontenelle, R. O. S.; Morais, S. M.; Brito, E. H. S.; Brilhante, R. S.N.; Cordeiro, R. A.; Nascimento, N. R. F.; Kerntopf, M. R.; Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. 2008. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**. 104, 1383-1390.

Gormez, A.; Bozari, S.; Yanmis, D.; Gulluce, M.; Sahin, F.; Agar, G. 2015. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of two species of Lamiaceae against phytopathogenic bacteria. **Polish Journal of Microbiology**. 64, 121-127.

Guo, S. S; You, C. X.; Liang, J. Y; Zhang, W. J.; Geng, Z. F.; Wang, C. F.; Du, S. S.; Lei, N. 2015. Chemical composition and bioactivities of the essential oil from *Etilingera yunnanensis* against two stored product insects. **Molecules**. 20, 15735-15747.

Isman, M. B.; Koul, O.; Luczynski, A.; Kaminski, J. 1990. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 38, 1406-1411.

Jeong, M-R; Park, P. B.; Kim, D-H; Jang, Y-S; Jeong, Y-S; Choi, S-H. 2009. Essential Oil Prepared from *Cymbopogon citrates* Exerted an Antimicrobial Activity Against Plant Pathogenic and Medical Microorganisms. **Mycobiology**. 37, 48-52.

Lima, G. P. G.; Souza, T. M.; Freire, G. P.; Farias, D. F.; Cunha, A. P.; Ricardo, N. M. P. S.; Morais, S. M. 2013. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **Parasitology Research**. 112, 1953-1958.

Lima, L. R; Pirani, J. R. 2008. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica**. 8, 177-231.

Lira, C. S.; Pontual, E. V.; Albuquerque, L. P.; Paiva, L. M. P.; Paiva, P. M. G.; Oliveira, J. V.; Napoleão, T. H.; Navarro, D. M. A. F. 2015. Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil). **Crop Protection**. 71, 95-100.

Liu, P.; Liu, X.C.; Dong, H.W.; Liu, Z.L.; Du, S.S.; Deng, Z.W. 2012. Chemical Composition and Insecticidal Activity of the Essential Oil of *Illicium pachyphyllum* Fruits against Two Grain Storage Insects. **Molecules**. 17, 14870-14881.

Liu, Z.L., Ho, S.H., 1999. Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**. 35, 317-328.

Liu, X. C.; Chen, X. B.; Liu, Z. L. 2014. Gas Chromatography-Mass Spectrometric Analysis and Insecticidal Activity of Essential Oil of Aerial Parts of *Mallotus apelta* (Lour.) Muell.-Arg. (Euphorbiaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. 13, 1515-1520.

Liu, Z. L.; Goh, S. H.; Ho, S. H. 2007. Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**. 43, 290-296.

López, M. D.; Pascual-Villalobos, M. J. 2015. Are monoterpenoids and phenylpropanoids efficient inhibitors of acetylcholinesterase from stored product insect strains? **Flavour and Fragrance Journal**. 30, 108-112.

Lopes, C. A.; Quezado-Duval, A. M. Epidemiologia e controle das bactérias das hortaliças. 2007. In: Zambolim, L.; Lopes, C. A.; Picanço, M. C.; Costa, H. **Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: Universitária, pp. 115-162.

Lucas, G. C.; Alves, E.; Pereira, R. B.; Perina, F. J.; Souza, R. M. 2012. Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 47, 351-359.

Magalhães, C. R. I.; Oliveira, C. R. F.; Matos, C. H. C.; Brito, S. S. S.; Magalhães, T. A.; Ferraz, M. S. S. 2015. Potencial inseticida de óleos essenciais sobre *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 17, 1150-1158.

Magalhães, C. R. I. 2014. **Utilização de óleos essenciais no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) e *Tribolium castaneum* Herbst. (Coleoptera: Tenebrionidae) em milho armazenado**. Dissertation. UFRPE, 72p.

Mazzonetto, F., Vendramim, J. D. 2003. Efeito de pós de origem vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) em feijão armazenado. **Neotropical Entomology**. 32, 145-149.

Melo, L. A.; Tebaldi, N. D.; Mehta, A.; Marques, A. S. A. 2014. Comparing *Acidovorax citrulli* strains from melon and watermelon: Phenotypic characteristics, pathogenicity and genetic diversity. **Tropical plant pathology**, 39, 154-162.

Michereff, S. J. 2001. **Fundamentos de Fitopatologia**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 150p.

Nogueira, L. M.; Silva, M. R.; Santos, S. M.; Albuquerque, J. F. C.; Ferraz, I. C.; Albuquerque, T. T.; Motta, C. R. F. C.; Araújo, R. M.; Viana, G. S. B.; Martins, R. D.; Havt, A.; Ximenes, R. M. 2015. Antinociceptive effect of the essential oil obtained from the leaves of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae) in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2015, 1-7.

Napoleão, T. H.; Agra-Neto, A., C.; Belmonte, B. R.; Pontual, E. V.; Paiva, P. M. G. 2015. Biology, ecology and strategies for control of stored-grain beetles: a review. In: STACK, C. **Beetles: Biodiversity, Ecology and Role in the Environment (Insects and Other Terrestrial**

**Arthropods: Biology, Chemistry and Behavior**). United States, Nova York: Nova Science Publishers Inc, 2015. pp. 105-121.

Napoleão, T. H.; Belmonte, B. R.; Pontual, E. V.; Albuquerque, L.P.; Sá, R. A.; Paiva, L. M.; Coelho, L.C. B. B.; Paiva, P. M. G. 2013. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**. 54, 26-33.

Nerio, L.S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E. 2010. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**. 101, 372–378.

Ramos, J. M. O.; Santos, C. A.; Santana, D. G.; Santos, D. A.; Alves, P. B.; Thomazzi, S. M. 2013. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 23, 644-650.

Rossi, D.; Guerrini, A; Maietti, S.; Bruni, R; Paganetto, G.; Poli, F.; Scalvenzi, L.; Radice, M.; Saro, K.; Sacchetti, G. 2011. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? **Food Chemistry**. 126, 837-848.

Sahin, F.; Gulluce, M.; Daferera, D.; Sokmen, A.; Polissiou, M.; Agar G.; Ozer, H. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**. 15, 549-557.

Santos, G. K. N.; Dutra, K. A.; Lira, C. S.; Lima, B. N.; Napoleão, T. H.; Paiva, P. M. G.; Maranhão, C. A.; Brandão, S. S. F.; Navarro, D. M. A. F. 2014. Effects of *Croton rhamnifolioides* Essential Oil on *Aedes aegypti* Oviposition, Larval Toxicity and Trypsin Activity. **Molecules**. 19, 16573-16587.



Silva, J. S.; Sales, M. F.; Gomes, A. P. S.; Carneiro-Torres, D. S. 2010. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**. 24, 441-153.

Soares, C. S. A.; Silva, M.; Costa, M. B.; Bezerra, C. E. S.; Carvalho, L. M.; Soares, A. H. V. 2012. Atividade inseticida de óleos essenciais sobre o pulgão da roseira *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). **Revista Brasileira de Agroecologia**. 7, 169-175.

Souza, V. N.; Oliveira, C. R. F.; Matos, C. H. C.; Almeida, D. K. F. 2016. Fumigation toxicity of essential oils against *Rhizopertha dominica* (f.) in stored maize grain. **Revista Caatinga**. 29, 435-440.

Stefanazzi, N.; Stadler, T.; Ferrero, A. 2011. Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Pest Management Science**. 67, 639-646.

Tefera, T., Kanampiu, F., De Groot, H., Hellin, J., Mugo, S., Kimenju, S., Beyene, Y., Boddupalli, P.M., Shiferaw, B., Banziger, M., 2011. The metal silo: an effective grain storage technology for reducing post-harvest insect and pathogen losses in maize while improving smallholder farmers' food security in developing countries. **Crop Protection** 30, 240-245.

Van Den Dool, H.; Kratz, P. D. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**. 11, 463-471.

Vasinauskiene, M.; Radusiene, J.; Zitikaite, I.; Surviliene, E. 2006. Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. **Agronomy Research**. 4, 437-440.

Vidaver, A. K; Lambrecht, P. A. 2004. Bacteria as plant pathogens. **The Plant Health Instructor**. Available in: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/bacteria.aspx>. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0809-01.

Vunda, S. L. L.; Sauter, I. P; Cibulski, S. P.; Roehle, P. M.; Bordignon. S. A. L.; Rott, M. B.; Apel, M. A.; Von Poser, G. L. 2012. Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. **Journal of Parasitology Research**. 111, 961-966.

You, C. X.; Yang, K.; Wu, Y.; Zhang, W. J.; Wang, Y.; Geng, Z. F.; Chen, H. P.; Jiang, H. Y.; Du, S. S.; Deng, Z. W. 2014. Chemical composition and insecticidal activities of the essential oil of *Perilla frutescens* (L.) Britt aerial parts against two stored product insects. **European Food Research and Technology**. 239, 481-490.

Yuya, A. I., Tadesse, A., Azerefegne, F., Tefere, T., 2009. Efficacy of combining Niger seed oil with malathion 5% dust formulation on maize against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**. 45, 67-70.

Xie, Y. S.; Bodnaryk, R. P.; Fields, P. G. 1996. A rapid and simple flour-disk bioassay for testing substances active against stored-product insects. **Canadian Entomology** .128, 865-875.

Ximenes, R. M.; Nogueira, L. M.; Cassundé, N. M. R.; Jorge, R. J. B.; Santos, S. M.; Magalhães, L. P. M.; Sena, K. X. F. R.; Albuquerque, J. F. C.; Martins, R.D. 2013. Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. essential oil. **Journal of Natural Medicines**. 67, 758-764.

Zhou, H. Y.; Zhao, N. N.; Du, S. S.; Yang, K.; Wang, C. F.; Liu, Z. L.; Qiao, Y. J. 2012. Insecticidal activity of the essential oil of *Lonicera japonica* flower buds and its main constituent compounds against two grain storage insects. **Journal of Medicinal Plants Research**. 6, 912-917.

## Appendice

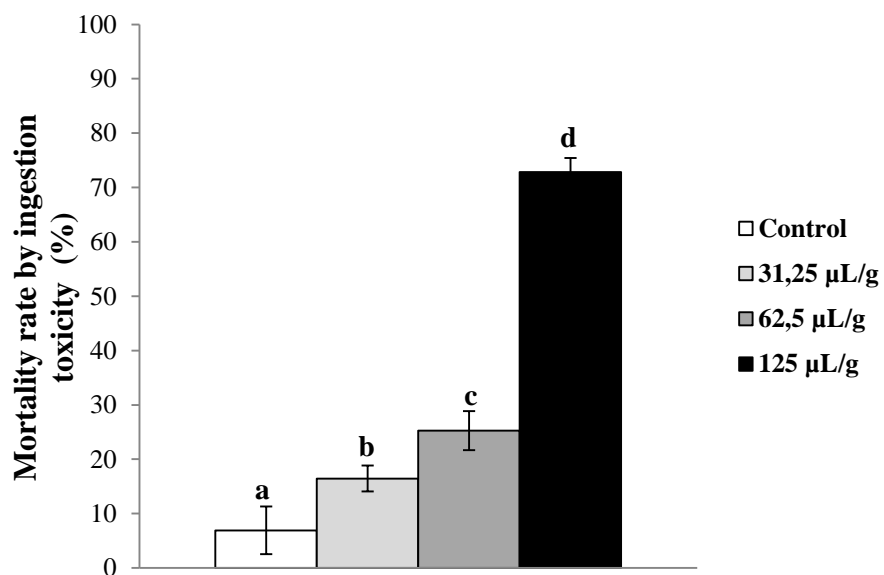
**Table 01** - Chemical composition of essential oils from *C. rudolphianus* leaves.

Compound	LRI lit. <sup>1</sup>	LRI calc. <sup>2</sup>	Relative area (%) ± S.D. EOCRC
α-Thujene	924	926	0.11 ± 0.15
α-Pinene	932	932	1.84 ± 1.60
Camphene	946	946	0.02 ± 0.02
N.I.		957	0.15 ± 0.14
Sabinene	969	972	6.33 ± 10.64
β-Pinene	974	975	0.46 ± 0.69
Myrcene	988	991	0.89 ± 0.61
α-Phellandrene	1002	1003	0.52 ± 0.59
α-Terpinene	1014	1016	0.14 ± 0.17
p-Cymene	1022	1024	0.23 ± 0.27
Limonene	1024	1028	7.01 ± 8.07
N.I.		1043	0.21 ± 0.23
(E)-β-Ocimene	1044	1049	0.21 ± 0.11
γ-Terpinene	1054	1058	0.40 ± 0.38
Terpinolene	1086	1088	0.09 ± 0.09
Linalool	1095	1099	0.05 ± 0.09
(Z)-3-hexenyl isobutyrate	1146	1145	0.02 ± 0.03
Terpinene-4-ol	1177	1177	0.17 ± 0.28
(E)-3-Hexenyl butyrate	1185	1187	0.01 ± 0.01
<b>Methyl chavicol</b>	<b>1196</b>	<b>1198</b>	<b>20.55 ± 35.49</b>
(Z)-3-Hexenyl isovalerate		1233	0.01 ± 0.02
(E)-anethole	1284	1286	0.04 ± 0.06
Bornyl acetate	1288	1287	0.02 ± 0.01
(Z)-Hexenyl tiglate	1319	1326	0.02 ± 0.03
Bicycloelemene	1336	1338	0.28 ± 0.09
α-cubenene	1345	1351	0.31 ± 0.34
N.I.		1354	0.06 ± 0.06
Eugenol	1356	1359	4.78 ± 8.15
α-copaene	1374	1378	1.14 ± 1.04
β-bourbonene	1387	1387	0.47 ± 0.36
β-cubenene	1387	1392	0.66 ± 0.71
β-elemene	1389	1394	0.33 ± 0.13
Methyl eugenol	1403	1406	0.03 ± 0.05
α-gurjunene	1409	1411	0.12 ± 0.06
<b>(E)-Caryophyllene</b>	<b>1417</b>	<b>1422</b>	<b>11.21 ± 6.00</b>
β-copaene	1430	1431	0.12 ± 0.06
α-trans-bergamotene	1432	1438	0.17 ± 0.07
Aromandrene	1439	1441	0.17 ± 0.10
N.I.		1446	0.10 ± 0.05
(E)-3,5-Muroladiene	1451	1453	0.46 ± 0.57

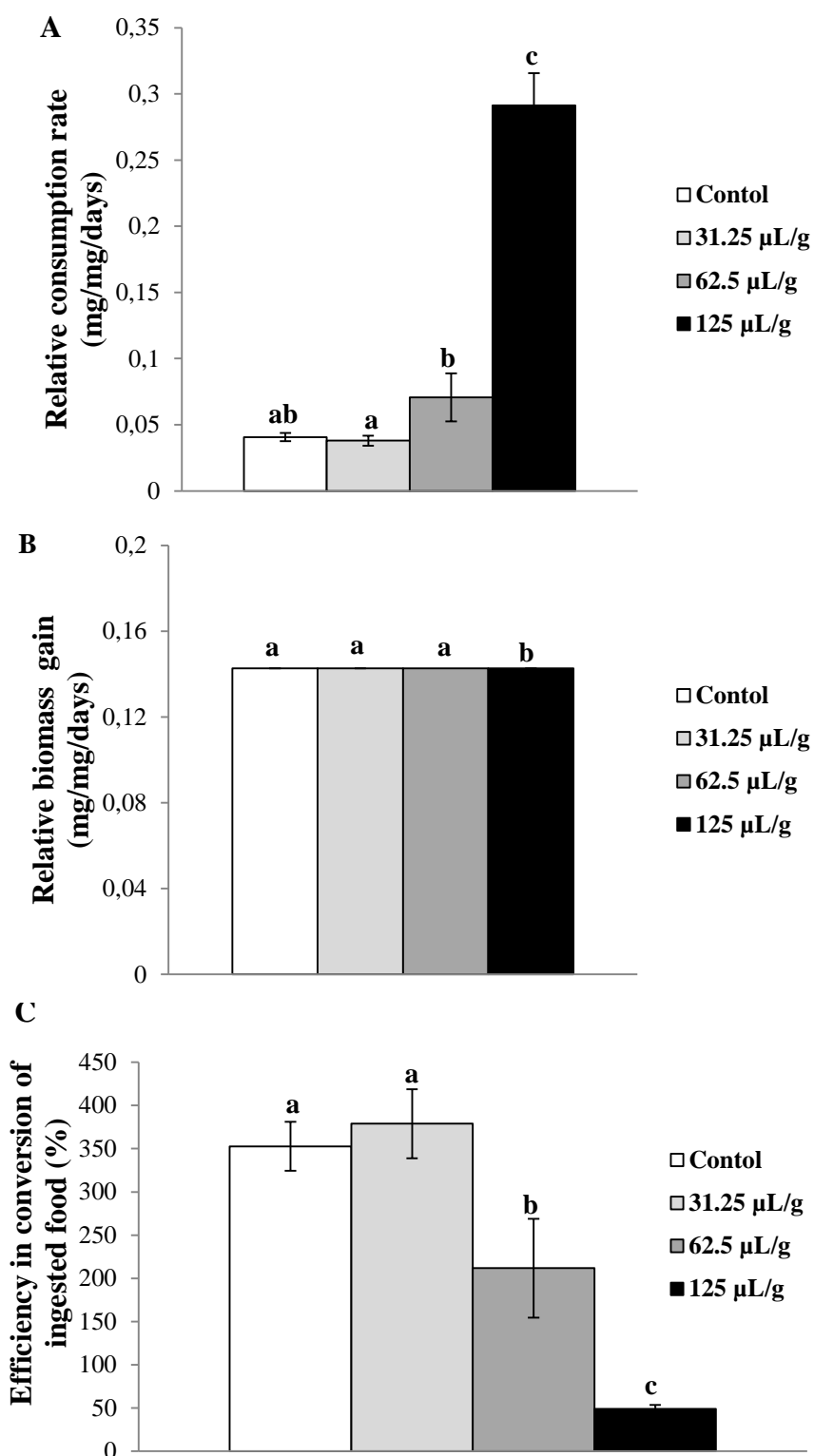
**Table 01** - Chemical composition of essential oils from *C. rudolphianus* leaves (continuação).

Compound	LRI lit. <sup>1</sup>	LRI calc. <sup>2</sup>	Relative area (%) ± S.D.
Humulene	1452	1456	1.54 ± 0.93
9-epi-Caryophyllene	1464	1463	0.55 ± 0.18
trans-Cadina-1(6),4-diene	1475	1476	0.57 ± 0.68
γ-murolene	1478	1479	0.16 ± 0.05
<b>Germacrene D</b>	<b>1480</b>	<b>1482</b>	<b>7.51 ± 5.57</b>
β-selinene	1485	1489	0.11 ± 0.10
trans-Muurolo-4(14),5-diene	1491	1495	0.67 ± 0.72
N.I.		1497	2.66 ± 1.27
<b>Bicyclogermacrene</b>	<b>1499</b>	<b>1500</b>	<b>10.23 ± 4.63</b>
α-murolene	1500	1503	0.22 ± 0.13
Germacrene A	1508	1508	0.17 ± 0.09
N.I.		1512	0.22 ± 0.05
γ-cadinene	1513	1515	2.68 ± 2.24
δ-cadinene	1522	1526	3.54 ± 3.60
Zonarene	1528	1529	0.25 ± 0.29
trans-cadina-1,4-diene	1533	1535	0.38 ± 0.44
Germacrene B	1559	1560	0.17 ± 0.17
( <i>E</i> )-nerolidol	1561	1565	0.09 ± 0.13
Spathulenol	1577	1581	1.56 ± 0.67
N.I.		1587	0.81 ± 0.31
N.I.		1591	0.17 ± 0.17
N.I.		1595	0.23 ± 0.13
Guaiol	1600	1600	0.41 ± 0.66
N.I.		1606	0.41 ± 0.20
1-epi-Cubenol	1627	1631	0.80 ± 0.91
N.I.		1641	0.86 ± 0.79
N.I.		1646	0.18 ± 0.10
N.I.		1649	0.09 ± 0.07
N.I.		1655	0.27 ± 0.03
(2 <i>E</i> .6 <i>Z</i> )-Farnesal	1713	1717	0.08 ± 0.15
(2 <i>Z</i> . 6 <i>E</i> )-Farnesol	1722	1723	0.12 ± 0.21
(2 <i>E</i> .6 <i>E</i> )-Farnesal	1740	1744	0.13 ± 0.23
(2 <i>E</i> .6 <i>E</i> )-Methyl farnesoate	1783	1787	1.04 ± 1.80
Cembrene	1937	1935	0.11 ± 0.14
N.I.		1949	0.05 ± 0.08
N.I.		2055	0.80 ± 0.78
N.I.		2072	0.22 ± 0.21
<b>Total identified</b>		<b>92.48</b>	
<b>Monoterpene hydrocarbons</b>		18.25	
<b>Oxygenated monoterpenes</b>		0.24	
<b>Sesquiterpene hydrocarbons</b>		44.19	
<b>Oxygenated sesquiterpenes</b>		3.19	
<b>Others</b>		26.61	

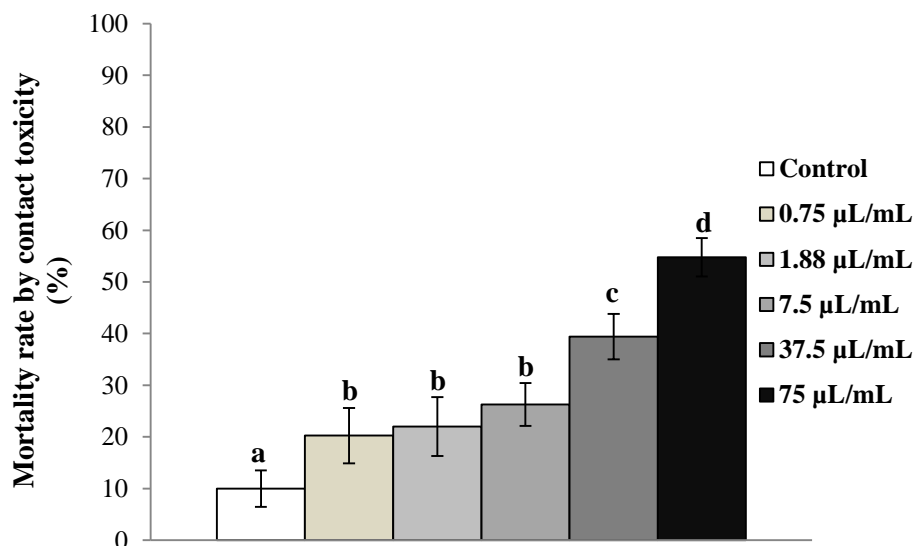
<sup>1</sup>Linear retention indices from the literature; <sup>2</sup>Linear retention indices calculated from retention times in relation to those of a series of *n*-alkanes separated on a non-polar DB-5 capillary column. N.I.: not identified compound.



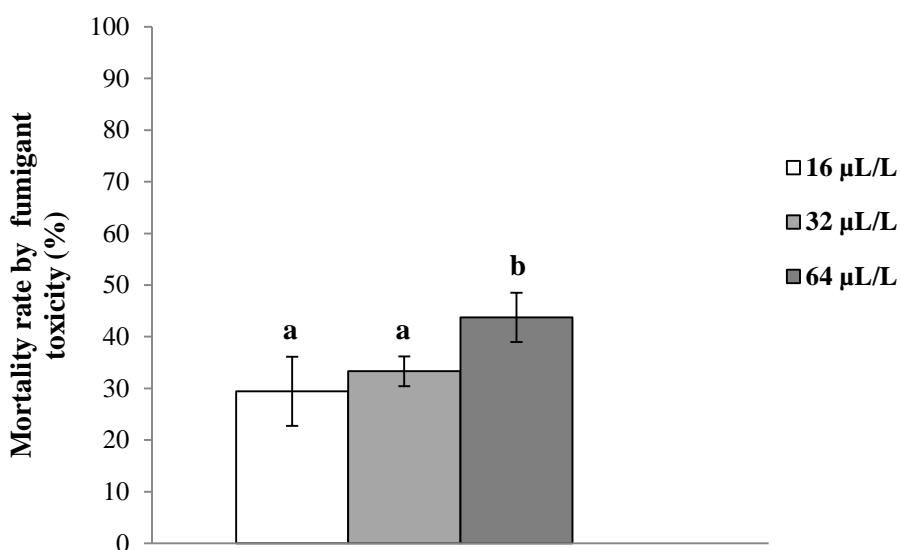
**Fig. 01** - Mortality rate on *Sitophilus zeamais* by ingestion toxicity of *Croton rudolphianus* essential oil. The control was distilled water and 1% tween 80. Each bar corresponds to the mean  $\pm$  SD. Different letters indicate significant ( $\alpha = 0.05$ ) differences between treatments by Tukey's test.



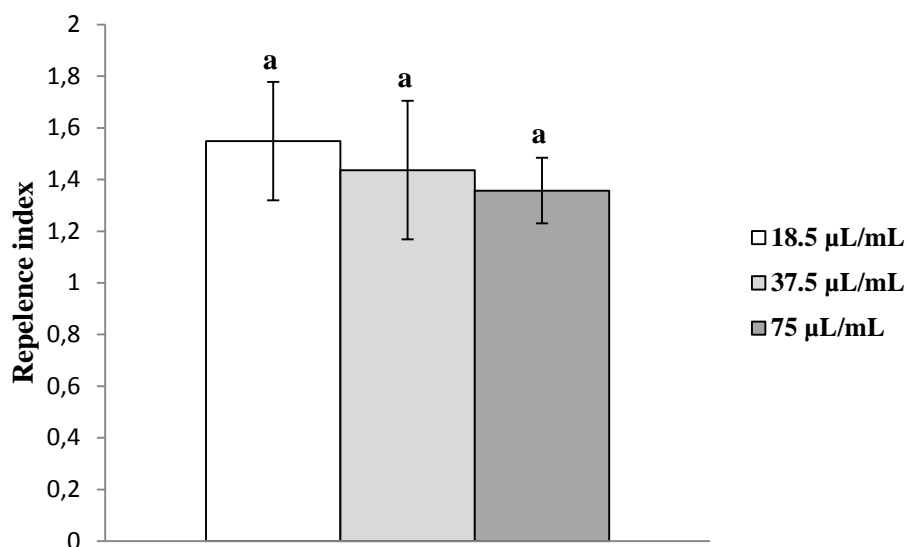
**Fig. 02** - Nutritional parameters of *Sitophilus zeamais* adults maintained on artificial diets containing solution of *Croton rudolphianus* essential oil or the control. (A) The relative consumption rate indicates the amount of food consumed (mg) per mg of body weight per day. (B) The relative biomass gain rate indicates the biomass (mg) gained every day per mg of initial body weight. (C) The efficiency in conversion of ingested food (%) indicates the amount of ingested food converted in biomass by the insects. Each bar corresponds to the mean  $\pm$  SD. Different letters indicate significant ( $\alpha = 0.05$ ) differences between treatments by Tukey's test.



**Fig. 03** - Mortality rate on *Sitophilus zeamais* by contact toxicity of *Croton rudolphianus* essential oil. The control was distilled water and 1% tween 80. Each bar corresponds to the mean  $\pm$  SD. Different letters indicate significant ( $\alpha = 0.05$ ) differences between treatments by Tukey's test.



**Fig. 04** - Mortality rate on *Sitophilus zeamais* by fumigant toxicity of *Croton rudolphianus* essential oil. Each bar corresponds to the mean  $\pm$  SD of five replicates. Different letters indicate significant ( $\alpha = 0.05$ ) differences between treatments by Tukey's test.



**Fig. 05** - Repelence index of *Croton rudolphianus* essential oil on *Sitophilus zeamais*. Each bar corresponds to the mean  $\pm$  SD. Different letters indicate significant ( $\alpha = 0.05$ ) differences between treatments by Tukey's test.

**Table 02** - Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of the essential oil from *Croton rudolphianus* leaves against phytopathogenic bacterial.

Species	MIC $\pm$ S.D. ( $\mu\text{L/mL}$ )	MBC $\pm$ S.D. ( $\mu\text{L/mL}$ )
<i>Acidovorax citrulli</i>	>100	>100
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	4.68 $\pm$ 2.21	25 $\pm$ 0
<i>Ralstonia solanacearum</i>	1.56 $\pm$ 0	>100 $\pm$ 0
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	3.125 $\pm$ 0	37.5 $\pm$ 17.67
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	4.68 $\pm$ 2.21	37.5 $\pm$ 17.67
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	4.68 $\pm$ 2.21	100 $\pm$ 0



## 5. CONCLUSÕES

- ✓ Um total de 77 compostos foi identificado do OE de *C. rudolphianus*, onde o composto majoritário foi metil chavicol, seguido de (*E*)-cariofileno, biciclogermacreno, germanceno D e limoneno.
  
- ✓ O OE apresentou atividade inseticida contra adultos de *S. zeamais* por contato, fumigação e ingestão. Além disso, o óleo exerceu efeitos nos parâmetros nutricionais dos insetos e foi atrativo para os insetos.
  
- ✓ O óleo de *C. rudolphianus* mostrou-se ativo contra cinco bactérias fitopatogênicas (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*).

# **ANEXOS**

**Anexo - A:** Autorização para coleta do material vegetal no PARNA do Catimbau, emitida pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio, Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

**Autorização para atividades com finalidade científica**

<b>Número:</b> 26743-3	<b>Data da Emissão:</b> 18/07/2016 20:59	<b>Data para Revalidação*:</b> 17/08/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

**Dados do titular**

Nome: ALEXANDRE GOMES DA SILVA	CPF: 038.585.604-05
Título do Projeto: Atividade Antimicrobiana da Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil	
Nome da Instituição: EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUARIA	CNPJ: 10.912.293/0001-37

**Cronograma de atividades**

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material botânico	06/2015	12/2019

**Observações e ressalvas**

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

**Outras ressalvas**

1	Sem ressalvas
---	---------------

**Locais onde as atividades de campo serão executadas**

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BUIQUE	PE	PARQUE NACIONAL DO CATIMBAU	UC Federal

**Atividades X Táxons**

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Angiospermae (*Qtde: 5), Pteridophyta (*Qtde: 5), Magnoliophyta (*Qtde: 5), Bryophyta (*Qtde: 5)

\* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 88432129**



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 26743-3	<b>Data da Emissão:</b> 18/07/2016 20:59	<b>Data para Revalidação*:</b> 17/08/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: ALEXANDRE GOMES DA SILVA	CPF: 038.585.604-05
Título do Projeto: Atividade Antimicrobiana da Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil	
Nome da Instituição : EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUARIA	CNPJ: 10.912.293/0001-37

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Plantas)	Madeira, Ramos, Semente, Caule, Seiva, Raízes, Rizoma, Frutos/estróbilos, Óleos/Resinas/Látex, Casca, Folhas, Flor, Perfilho/rebento
2	Método de captura/coleta (Plantas)	Coleta manual

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUARIA	colecção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 88432129**



Página 2/3



## Anexo - B: Crop Protection- Instructions for Authors



### CROP PROTECTION

The Official Journal of the International Association for the Plant Protection

#### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

•	<b>Description</b>	p.1
•	<b>Audience</b>	p.1
•	<b>Impact Factor</b>	p.1
•	<b>Abstracting and Indexing</b>	p.2
•	<b>Editorial Board</b>	p.2
•	<b>Guide for Authors</b>	p.5



### DESCRIPTION

The Editors of *Crop Protection* especially welcome papers describing an interdisciplinary approach showing how different **control strategies** can be integrated into practical **pest management** programs, covering high and low input **agricultural systems** worldwide. *Crop Protection* particularly emphasizes the practical aspects of control in the field and for **protected crops**, and includes work which may lead in the near future to more effective control. The journal does not duplicate the many existing excellent biological science journals, which deal mainly with the more fundamental aspects of plant pathology, applied zoology and weed science. *Crop Protection* covers all practical aspects of **pest, disease** and **weed control**, including the following topics:

Abiotic damage Agronomic control methods Assessment of pest and disease damage Molecular methods for the detection and assessment of pests and diseases Biological control Biorational pesticides Control of animal pests of world crops Control of diseases of crop plants caused by microorganisms Control of weeds and integrated management Economic and social considerations Effects of plant growth regulators Environmental benefits of reduced pesticide use Environmental effects of pesticides Epidemiology of pests and diseases in relation to control GM Crops, and genetic engineering applications Importance and control of postharvest crop losses Integrated control Interrelationships and compatibility among different control strategies Invasive species as they relate to implications for crop protection Pesticide application methods Pest management Plant bioms: for pest and disease control Resistance management Sampling and monitoring schemes for diseases, nematodes, pests and weeds.

The editors of *Crop Protection* invite workers concerned with pest, disease and weed control to submit suitable contributions on any topic falling within the aims and scope of the journal.

### AUDIENCE

Research workers, project planners, commercial producers.

### IMPACT FACTOR

2015: 1.652 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

## ABSTRACTING AND INDEXING

### AGRICOLA

Agricultural Engineering Abstracts  
 Biotechnology Research Abstracts  
 Elsevier BIOBASE  
 Chemical Abstracts  
 Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences  
 Index to Scientific Reviews  
 Index to South African Periodicals  
 Irrigation and Drainage Abstracts  
 Field Crop Abstracts  
 GEOBASE  
 Helminthological Abstracts  
 Horticultural Abstracts  
 Plant Breeding Abstracts  
 Review of Applied Entomology  
 Review of Plant Pathology  
 Risk Abstracts  
 Science Citation Index  
 Soils and Fertilizers  
 Scopus  
 EMBiology

## EDITORIAL BOARD

### *Principal Editors*

**B.S. Chauhan**, University of Queensland, Toowoomba, Queensland, Australia

Weed ecology and biology, seed ecology, integrated weed management, herbicide use and herbicideresistance management, conservation agriculture

**J. Correll**, University of Arkansas, Fayetteville, Arkansas, USA

Crop pathogens such as fungi, oomycetes, bacteria, viruses, other microbes.

**J.V. Cross**, East Malling Research, East Malling, Kent, UK

Pesticide applications, entomology, integrated pest management, tropical pest management. Invertebrate crop pests including insects, mites and molluscs. Vertebrate crop pests including mammals and birds. Pesticides and crop protection agents application technology (spraying methodology)

**L Korsten**, University of Pretoria, Pretoria, South Africa

Food Safety, Food security, Postharvest pathology, biological control, Plant pathology, citrus black spot, Penicillium, water quality, food borne pathogens, plant pathogens, microbial ecology, phytosanitary issues.

**F.P.F. Reay-Jones**, Clemson University, Florence, South Carolina, USA

Invertebrate crop pests including insects, mites and molluscs. Vertebrate crop pests including mammals and birds. Knowledge and technology transfer in crop protection. Integrated Pest Management in Field Crop Systems.

**S.N. Wegulo**, University of Nebraska at Lincoln, Lincoln, Nebraska, USA

Crop pathogens such as fungi; oomycetes; bacteria; viruses; other microbes and nematodes.

### *Statistical Consultant:*

**C. Ritz**, University of Copenhagen, Frederiksberg C, Denmark

**Editorial Board:**

**X. Chen**, Washington State University, Pullman, Washington, USA

Epidemiology and control of rusts, including cultural, chemical, and disease resistance; disease forecasting models; virulence, population structures, and functional genomics; genetics and molecular mapping of disease resistance genes; molecular mechanisms of plant-pathogen interactions.

**C.A. Edwards**, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA

Applied soil ecology and ecotoxicology.

**W. Elmer**, Connecticut Agricultural Experimental Station, New Haven, Connecticut, USA

Management of Fusarium diseases; biological control on Soilborne plant pathogens; mineral nutrition effects on Soilborne plant pathogens.

**L. Gatehouse**, HortResearch Palmerston North, Palmerston North, New Zealand

Molecular Biology, particularly of insects and plants. This covers straight molecular biology and extends to plant and some insect transgenesis together with the expression and analysis of the expression of introduced genes. I have some experience of Biochemistry but do not consider myself an expert. I have a blind spot with Statistics and am most definitely not an expert. I have worked with insect viruses, insect symbionts and insect cell lines for baculovirus expression and other studies. Most of my work has been in the field of Plant Insect interactions looking at this from both sides and usually with a focus on crop protection.

**D.P. Giga**, Bulawayo, Zimbabwe

Stored Products Entomology (crop storage).

**L. Godfrey**, University of California, Davis, Davis, California, USA

Entomology, crop response, integrated pest management, cotton, rice, field crops.

**A.R. Hardy**, Central Science Laboratory, York, UK

**S. Hashim**, University of Agriculture Peshawar, Pakistan

**W.D. Hutchison**, University of Minnesota, St Paul, Minnesota, USA

Biological Control and Integrated Management of Arthropod Pests.

**K Jabran**

**W.J. Janisiewicz**, U.S. Department of Agriculture (USDA), Kearneysville, West Virginia, USA

**J. Katan**, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel

Soil-borne, pathogens, soil solarization, soil disinfestation.

**J.R. Lamichhane**, French National Institute for Agricultural Research (INRA), Thiverval Grignon, France

Plant disease epidemiology and management; Biological control; Climate change and pest evolution; Yield losses due to pests (pathogens, animal pests and weeds); Integrated pest management.

**S. Liu**, Nat. Pingtung University of Sci. & Tech., Pingtung Hsien, Taiwan, ROC

Crop eco-physiological adaptation to arid environment; field crops management; ecosystem sustainable designing and the role of human being in restoring and conserving the structure and function of integrated ecosystem especially in the arid and semiarid regions in northwest of China and other similar regions in the world.

**G Mahajan**

**G.A. Matthews**, Imperial College London, Ascot, UK

Pesticides and their application; entomology; integrated pest/ crop management (IPM); crops esp Cotton; control of vectors of human diseases eg malaria but that has only to do with farmers' health and not crop protection.

**P.D. Mitchell**, University of Wisconsin at Madison, Madison, Wisconsin, USA

Crop economics; production economics; farm management; risk management; insect management; weed management; resistance management; transgenic crops; biotechnology; agricultural sustainability metrics.

**S.E. Naranjo**, USDA-ARS, Arid-Land Agricultural Research Center, Maricopa, Arizona, USA

IPM of arthropod pests, Insect biological control, insect population ecology, sampling and economic thresholds, risk assessment in GM crops.

**R.E.L. Naylor**, University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland, UK



**O.M. Olanya**, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Wyndmoor, Pennsylvania, USA

**M.T. Rahman**, Government of Western Australia Biosecurity and Regulation, South Perth, Western Australia, Australia

**K.W. Seebold**, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA

Soilborne plant pathogens ecology and epidemiology (cotton and vegetable crops) Fungicide resistance and resistance management Integrated pest management Mycology Epidemiology and management of plant disease

**P.C. Stevenson**, University of Greenwich, Chatham, UK

Plant chemistry; phytochemistry; pollinators; bees; pesticidal plants; botanical insecticides; crop resistance.

**J.C. Streibig**, University of Copenhagen, Taastrup, Denmark

Weed science and vegetation management.

**M.E. Tobin**, U.S. Department of Agriculture (USDA), Fort Collins, Colorado, USA

Human-wildlife conflicts, wildlife crop damage, wildlife damage control

**P. Trematerra**, Università degli Studi del Molise, Campobasso, Italy

Applied entomology; integrated pest management; insect crop pests; stored product pests; pheromones and application technology; stored products protection.

**A. van der Meulen**

**J. van der Waals**, University of Pretoria, Pretoria, South Africa

**D. Wright**, Imperial College London, Ascot, UK

Entomology Plant nematology Integrated Pest Management Biological control Biopesticides

Pheromones Multitrophic interactions.

**C. Zhang**, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China

Weed Biology and Management, Herbicide Resistance and Management, Herbicide Application.

## GUIDE FOR AUTHORS

### *Your Paper Your Way*

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. **To find out more, please visit the Preparation section below.**

## INTRODUCTION

The Editors of *Crop Protection* especially welcome papers describing an interdisciplinary approach showing how different control strategies can be integrated into practical pest management programmes, covering high and low input agricultural systems worldwide. *Crop Protection* particularly emphasizes the practical aspects of control in the field and for protected crops, and includes work which may lead in the near future to more effective control. The journal does not duplicate the many existing excellent biological science journals, which deal mainly with the more fundamental aspects of plant pathology, applied zoology and weed science. *Crop Protection* covers all practical aspects of pest, disease and weed control, including the following topics:

Abiotic damage

Agronomic control methods

Assessment of pest and disease damage

Biological control

Biorational pesticides

Control of animal pests of crops

Control of diseases of crop plants caused by microorganisms

Control of weeds and integrated management

Economic and social considerations  
 Effects of plant growth regulators  
 Environmental benefits of reduced pesticide use  
 Environmental effects of pesticides  
 Epidemiology of pests and diseases in relation to control  
 Food safety  
 GM Crops, and genetic engineering applications  
 Importance and control of postharvest crop losses  
 Integrated control  
 Interrelationships and compatibility among different control strategies  
 Invasive species as they relate to implications for crop protection  
 Pesticide application methods  
 Pest management  
 Resistance management  
 Sampling and monitoring schemes for diseases, nematodes, pests and weeds.

The editors of *Crop Protection* invite workers concerned with pest disease and weed control to submit suitable contributions on any topic falling within the aims and scope of the journal.

#### *Types of paper*

Contributions falling into the following categories will be considered for publication:

- Perspectives in Crop Protection articles - The editors and members of the editorial board will invite commentary/insight papers on topical issues. Authors should contact the Editors-in-Chief with potential ideas. New data will not be published in commentary papers, but one table or figure to illustrate key points may be included (e.g., pesticide use or crop yield trends). The papers should range from 2000-3000 words or 6-8 double-line spaced manuscript pages (including references cited). The articles will be peer-reviewed with emphasis given to rapid publication.
- State of the art Review articles - Authors should contact the relevant Editor-in-Chief with proposals before submitting.
- Original high-quality Research papers - Preferably no more than 20 double-line spaced manuscript pages, including tables and illustrations.
- Short communications - These should not exceed 6-8 double-line spaced manuscript pages excluding references and legends. Results reported must be based on repeated trials or experiments. Submissions should include a short Abstract not exceeding 10% of the length of the communication and which summarizes briefly the main findings of the work to be reported. The bulk of the text may be in a continuous form but generally will follow the usual format that does not require numbered sections such as Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. However, a Cover page, Abstract and a list of Keywords are required at the beginning of the communication and Acknowledgements and References at the end. These components are to be prepared in the same format as used for full-length research papers. Occasionally authors may use sub-titles of their own choice to highlight sections of the text.
- Correspondence - Authors should contact the relevant Editor-in-Chief with a proposal before submitting. Correspondence should focus on the scientific basis for comment or disagreement with a recently published article in the *Crop Protection* journal, and be a maximum of 4-5 pages with doubleline spacing, and a limited number of relevant citations. Correspondence will be peer-reviewed, but processed in a timely manner. Upon receipt of a

correspondence that is critical of a previous article in Crop Protection, the author(s) of the previous article will also be invited to submit a rebuttal article; both the original letter and rebuttal letter will be published in the same issue.

- Crop Protection also publishes, book reviews, conference reports and a calendar of forthcoming events. Please contact one of the Editors-in-Chief.

For all article formats, also review recent published examples.

## **BEFORE YOU BEGIN**

### ***Ethics in publishing***

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

### ***Declaration of interest***

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. More information.

### ***Submission declaration and verification***

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

### ***Changes to authorship***

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### ***Article transfer service***

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

*Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

*Funding body agreements and policies*

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

*Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

*Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

*Green open access*

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 24 months.

*Elsevier Publishing Campus*

The Elsevier Publishing Campus ([www.publishingcampus.com](http://www.publishingcampus.com)) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

*Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

*Submission*

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All

correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Papers will be assigned to the Editors by subject:

Prof. J. Correll - Crop pathogens such as fungi, oomycetes, bacteria, viruses, other microbes

Prof. J.V. Cross - Invertebrate crop pests including insects, mites and molluscs. Vertebrate crop pests including mammals and birds, pesticides and crop protection agents application technology (spraying methodology)

Assoc.Prof. F.P.F. Reay-Jones - Invertebrate crop pests including insects, mites and molluscs. Vertebrate crop pests including mammals and birds. Knowledge and technology transfer in crop protection

Prof. J.C. Streibig - Weed science and vegetation management

Prof. S.N. Wegulo - Crop pathogens such as fungi, oomycetes, bacteria, viruses, other microbes and nematodes

Papers in agricultural economics and vertebrate control will be handled by one of the above Editors.

*Repeat experiments.* Repeat experiments. Manuscripts that report original research should not be submitted unless experiments have been conducted **at least twice** or, in the case of field experiments, relate to two seasons. In most cases, three or more replications will be necessary for appropriate statistical analysis. In exceptional circumstances, studies that do not meet these criteria may be acceptable, but the relevant Editor-in-Chief should be consulted prior to submission.

*Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/cropro/>

*Referees*

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 4 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

*Additional information*

*Review process*

All contributions are reviewed by two or more referees to ensure both accuracy and relevance, and revisions to the manuscript may thus be required. On acceptance, contributions are subject to editorial amendment to suit house style. When a manuscript is returned for revision prior to final acceptance, the revised version must be submitted as soon as possible after the author's receipt of the referee's reports. Revised manuscripts returned after four months will be considered as new submissions subject to full re-review.

## **PREPARATION**

### **NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

#### *References*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

#### *Formatting requirements*

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced and has consecutive line numbering - this is an essential peer review requirement.

#### *Figures and tables embedded in text*

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

### **REVISED SUBMISSIONS**

#### *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Line numbering, page numbering, and double line spacing are mandatory for submissions.

### **Article structure**

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

#### *Graphical abstract*



Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

#### *Highlights*

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

#### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### *Abbreviations*

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### *Acknowledgements*

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

#### *Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### *Nomenclature and Units*

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Authors and Editor(s) are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica should be identified by their scientific names. The species naming authority should be included with full Latin name at first mention in the abstract and in the body of the paper.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed where the compound is novel. For compounds more than two years old please use the approved name as given in the *Pesticide Manual*.

*Application of pesticides.* Full details must be given of techniques used to apply pesticides (e.g. type of equipment, type of nozzle, pressure, volume of spray, etc.) and of the amount of active ingredient applied per unit area.

### *Math formulae*

Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics.

Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Subscripts and superscripts should be clear.

Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter I.

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca<sup>2+</sup>, not as Ca<sup>++</sup>. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., <sup>18</sup>O.

### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
  - Number the illustrations according to their sequence in the text.
  - Use a logical naming convention for your artwork files.
  - Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
  - For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
  - Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available.
- You are urged to visit this site; some excerpts from**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

#### **References**

##### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/crop-protection>. When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

#### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s)

name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

#### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

*Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

#### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### ***Supplementary material***

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages.

### **RESEARCH DATA**

#### ***Database linking***

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). More information and a full list of supported databases.

#### ***Data deposit and linking***

Elsevier encourages and supports authors to share raw data sets underpinning their research publication where appropriate and enables interlinking of articles and data. More information on depositing, sharing and using research data.

#### ***AudioSlides***

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

#### ***Interactive plots***

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. Full instructions.

#### ***Submission checklist***

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

##### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white.

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our Support Center.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### ***Online proof correction***

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### ***Offprints***

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

## **AUTHOR INQUIRIES**

Track your submitted article

Track your accepted article

You are also welcome to contact the Elsevier Support Center.